

Aus dem

Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
der Tierärztlichen Fakultät München

Vorstand : Prof. Dr. R. Gothe

Arbeit angefertigt unter Anleitung von Prof. Dr. H.E. Krampitz,
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin

Leiter : Prof. Dr. med. W. Lang

Zur Diagnose und Verbreitung der einheimischen
Zecken - Borreliose beim Tier

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität München

von
Sonja Bark
aus
Bad Windsheim

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. R. Gothe

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. Ch. Ring

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

1. Die Stellung und Funktion der Geographie

Seite 1

1.1. Literaturrecherche

1.1.1. Funktion der Geographie

1.1.2. Kartographie

1.1.3. Klassifikation

1.1.4. Bedeutung der Geographie

1.1.5. Methoden

1.1.6. Bedeutung der Geographie

1.2. Kartographie

1.2.1. Kartographie

1.2.2. Kartographie

1.2.3. Kartographie

1.2.4. Kartographie

1.2.5. Kartographie

1.2.6. Kartographie

1.3. Kartographie

Meinen Eltern

2. Allgemeine Informationen

2.1.1. Karte

2.1.2. Karte

2.1.3. Karte

2.1.4. Karte

2.1.5. Karte

2.1.6. Karte

2.1.7. Karte

2.1.8. Karte

2.1.9. Karte

2.1.10. Karte

2.1.11. Karte

2.1.12. Karte

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	Seite 1
2. Literaturübersicht	4
2.1 Ätiologie der Ixodes-Borrelien	4
2.2 Bakteriologie	6
2.2.1 Klassifikation	6
2.2.2 Morphologie und Beweglichkeit	7
2.2.3 Färbbarkeit	7
2.2.4 Anzüchtung in Kulturmedien	7
2.3 Pathogenese	8
2.4 Borrelieninfectionen des Menschen	10
2.4.1 Epidemiologie	10
2.4.2 Klinisches Spektrum der Infectionen durch <i>Borrelia burgdorferi</i>	14
2.4.3 Diagnosemöglichkeiten	16
2.4.4 Therapie	17
2.5 Borrelieninfectionen der Wild- und Hausäugetiere . .	18
3. Eigene Untersuchungen	24
3.1 Material und Methoden	24
3.1.1 Zecken	24
3.1.2 Präparation der Zecken	27
3.1.3 Untersuchung der Präparate mit dem direkten Immunfluoreszenztest	28
3.1.4 Blutseren	29
3.1.4.1 Mäuseseren	29
3.1.4.2 Hundeseren	31
3.1.4.3 Rinderseren	31
3.1.5 Antigengewinnung für den indirekten Fluoreszenzantikörpertest (IFAT)	32
3.1.6 Durchführung des IFAT	39

3.1.7 Untersuchungen auf das Vorkommen von Kreuzreaktionen zwischen Borrelien und Leptospiren	Seite 43
3.1.7.1 Antigengewinnung für die Mikroagglutinationsreaktion (MAR) . .	43
3.1.7.2 Durchführung und Auswertung der MAR .	43
3.2 Ergebnisse	46
3.2.1 Der Nachweis von Borrelien in Zeckendarmpräparationen mit Hilfe des direkten Immunfluoreszenztestes.	46
3.2.2 Serologische Untersuchungen	49
3.2.2.1 Der Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Borrelien mit Hilfe des IFAT	49
3.2.2.1.1 Antikörper in Mäuseseren. .	49
3.2.2.1.2 Antikörper in Hundeseren. .	51
3.2.2.1.3 Antikörper in Rinderseren .	55
3.2.2.2 Kreuzreaktionen zwischen Borrelien und Leptospiren	57
3.2.2.2.1 Kaninchenserum.	57
3.2.2.2.2 Mäuseseren.	58
3.2.2.2.3 Hundeseren.	58
3.2.2.2.4 Rinderseren	65
4. Besprechung der Ergebnisse	71
4.1 Nachweis von Borrelien in Zeckendarmpräparationen .	71
4.2 Nachweis von Antikörpern gegen Borrelien in Tierseren	74
4.2.1 Mäuseseren.	74
4.2.2 Hundeseren.	77
4.2.3 Rinderseren	81
4.3 Kreuzreaktionen mit Leptospiren	82
5. Zusammenfassung	86
Summary	90
6. Literaturverzeichnis.	94

1. Einleitung und Problemstellung

Die Erkenntnis, daß Schildzecken (Familie Ixodidae) in den gemäßigten und kalten Breiten der Alten, wie auch der Neuen Welt beim Saugakt Spirochaeten ausscheiden und mit diesen Mensch und Tier infizieren können, ist neu. Nicht neu sind dagegen die Krankheitsbilder und Symptome der Schildzecken-Borreliose beim Menschen. Es konnte der Beobachtung natürlich nicht entgehen, daß zwischen dem Auftreten benigner, sehr charakteristischer Hauterkrankungen und einem vorausgegangenen Zeckenstich ein ursächlicher Zusammenhang zu bestehen pflegt. Man dachte zunächst an allergische Reaktionen auf das Speichelsekret der Blutsauger, an bakterielle Infektionen auf der Basis steckengebliebener Zeckenmundorgane und auch an Virusinfektionen. Als erster wies 1941 der Münchner Neurologe BANNWARTH darauf hin, daß der Mensch auch eine Meningitis und Polyneuritis nach Zeckenstich entwickeln kann, das Geschehen also nicht auf das Hautorgan beschränkt bleiben muß.

Das Spektrum der ätiologischen Möglichkeiten engte sich ein, als die experimentelle Übertragbarkeit der Hautveränderung (Erythema migrans) durch E. Binder, R. Doepfmer und O. Hornstein im Jahre 1955 gelang und die Hauteffloreszenzen sich gegenüber Penicillin als empfindlich erwiesen.

Bei den beständigen Mißerfolgen der Bakteriologen, auf und in den üblichen Nährmedien einen bakteriellen Erreger nachzuweisen, blieben nur noch zwei Erregergruppen verdächtig : Rickettsien und Schraubenbakterien.

Der endgültigen Identifizierung des ätiologischen Agens als *Borrelia burgdorferi* durch Burgdorfer et al. (1982) kam die vorausgegangene Entwicklung eines Nährmediums für *Blutspirochäten* durch Kelly (1971) sehr entgegen. Damit war die diagnostische *in vitro* Züchtung von *Borrelien* möglich geworden.

Die direkte Immunfluoreszenz begünstigte den Direktnachweis von *Borrelien* im Zeckenkörper, die indirekte gestattete den sicheren Nachweis spezifischer Antikörper im Patientenblut und im Liquor cerebrospinalis. Inzwischen ist die *Ixodes-Borreliose* des Menschen in Nordamerika und Europa weitgehend aufgeklärt. In den USA erwies sich als Motivierung für die Forschung das Auftreten von epidemischen Neuritiden und Arthritiden nach Zeckenstichen in dem Ort Lyme im US-Staat Connecticut, das auch den öffentlichen Gesundheitsdienst herausforderte. Seitdem erscheinen weltweit etwa 100 Publikationen pro Jahr über diese "Lyme-Krankheit".

Wir wissen, daß *Borrelia burgdorferi*, wie der Erreger nach seinem Entdecker heute genannt wird (1. Lyme Symposium, 1984), in Nordamerika vor allem durch *Ixodes dammini*, bei uns durch *Ixodes ricinus* übertragen wird und daß die *Borreliose* beim Menschen in drei aufeinanderfolgenden, sich teilweise überlappenden Stadien abläuft.

Entscheidend für die Diagnose ist der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *Borrelien*, denn die Variation der klinischen Symptome ist erheblich. Nach Ackermann (1985) ist allein in der Bundesrepublik Deutschland mit jährlich etwa 1000 Fällen von *Ixodes-Borreliose* beim Menschen zu rechnen. Bei der Dreiwirtigkeit der Überträgerzecken und bei Berücksichtigung des Umstandes, daß der Mensch als

Fehlwirt im Dasein der Vektoren eine durchaus verzichtbare Größe darstellt, lag der Verdacht nahe, daß es sich bei der Ixodes-Borreliose um eine neu erkannte Anthropozoonose handeln müsse. Die Schwierigkeit und Aufwendigkeit des direkten wie indirekten Erregernachweises macht das Bild jedoch schwer durchschaubar. Am weitesten ist man in Amerika. Dort ist es bewiesen, daß alle Wildtierarten, für die Ixodes dammini und Ixodes pacificus als Imaginal- und Präimaginalwirte von Bedeutung sind, Borrelia burgdorferi im Blut beherbergen können. Auch daß der Haushund an Lyme-Arthritis erkrankt sein kann, ist für die USA bewiesen. Von den einheimischen Basisreservoiriren für die europäische Standortvariante von B. burgdorferi ist dagegen fast nichts bekannt. Bereits Jahre bevor man etwas von der Lyme- oder Erythema-migrans-Krankheit wußte, wurde bei München ein Borrelienstamm aus Zecken in Versuchstieren isoliert (KRAUPITZ 1976).

Inzwischen liegen umfangreiche Untersuchungen bei Ixodes ricinus aus Süddeutschland vor, die eine Befallsrate von 20% ergeben haben, die allerdings örtlich stark schwanken kann.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, mittels einer Reihe von Stichprobenuntersuchungen erstmals die Rolle außermenschlicher Reservoirire für Borrelien, wie Kleinnagetiere, Rehwild, Hund und Rind, aufklären zu helfen.

Da das Erkrankte- zumindest des Hundes an Lyme-Krankheit aus Amerika bereits beschrieben ist, sollen dem Tierarzt diagnostische Empfehlungen für das Erkennen der neuen Ixodes-Borreliose gegeben werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Ätiologie der Borrelien

Im Jahre 1909 berichtete AFZELIUS über seine Erstbeobachtung eines Erythema migrans. BALBAN brachte 1910 die endgültige Beschreibung des emigrierenden Erythems und LIPSCHITZ (1913) schließlich beschrieb die langsame Ausdehnung des Erythems über 7 Monate und schlug gleichzeitig die heute übliche Bezeichnung "Erythema chronicum migrans" (E.c.m.) vor:

Schon in diesen frühen Arbeiten wurde auf die den Erkrankungen vorausgegangenen Zeckenstiche hingewiesen, später eine infektiöse Genese (BINDER et al., 1955) vermutet, eine Spirochäte als auslösendes Agens postuliert (LENHOFF, 1948); dieser Befund konnte jedoch von SCRIMENTI (1970) nicht reproduziert werden.

Komplikationen des E.c.m. wurden in der europäischen Literatur schon 1922 erstmals beschrieben (GARIN und BUYADOUX).

Erst das epidemiologische Auftreten einer Arthritis im Zusammenhang mit Zeckenstichen und E.c.m. in der Gemeinde Lyme in Connecticut/USA im Jahre 1975, von dem STEERE und Mitarbeiter berichten, ermöglichte die Durchführung intensiverer Untersuchungen.

Der Erreger, eine bisher unbekannte Spirochäte wurde von W. Burgdorfer 1982 aus *Ixodes dammini* isoliert. Ein Jahr später wurden in Blut, Haut und Liquor von Patienten mit Lyme-Disease, wie die neue Krankheit genannt wurde, ebenfalls derartige Spirochaeten entdeckt (BURGDORFER et al., 1983).

Die Erkenntnis ermöglichte es, auch die Ätiologie des europäischen Erythema migrans und seine Komplikationen aufzuklären. Auch hier handelt es sich um eine Spirochaete, die morphologisch mit der von Burgdorfer entdeckten nahezu identisch ist (BARBOUR et al., 1983).

Aus Patientenmaterial (Blut, Liquor und Hautproben) glückte es schließlich 1983 STEERE und Mitarbeitern, Spirochaeten anzuzüchten.

1984 wurde die Spirochaete als neue Borrelienart klassifiziert und erhielt den Namen : *Borrelia burgdorferi* (JOHNSON et al., 1984).

Mittlerweile ist es auch in Europa gelungen, den Erreger des E.c.m. aus Blut (ACKERMANN et al., 1984), Haut (NEUBERT 1984; ASBRINK et al., 1984) und Liquor (PREAC-MURSIC et al., 1984) zu isolieren.

Die Untersuchungen von ACKERMANN et al. im Jahre 1984 ergaben, daß die aus *Ixodes ricinus* isolierte Spirochaete sich als immunologisch verwandt mit *B. duttoni*, *Treponema pallidum* und dem Erreger der Lyme Disease, *Borrelia burgdorferi*, erwies. Die europäische Spirochaete soll sich von der nordamerikanischen lediglich in ihrer Reaktion mit monoklonalen Antikörpern und möglicherweise in ihrer elektronenmikroskopischen Gestalt unterscheiden.

2.2 Bakteriologie der Borrelien

2.2.1 Klassifikation

Stark gekürzte Systematik der Borrelien nach Bergey's
Manual of Systematic Bacteriology, 9. Auflage, 1984

Reich :	Procaryonta
Abteilung II der Procaryonta :	Bakterien
Teil V :	Spirochaeten
Ordnung :	Spirochaetales
Familie :	Spirochaetaceae
Gattung :	Borrelia

Die Gattung *Borrelia* umfaßt Schraubenbakterien, früher auch als Blutspirochaeten bezeichnet, die wenige, regelmäßige Windungen aufweisen. Sie ruft vor allem außereuropäische akute Infektionskrankheiten hervor.

B. recurrentis verursacht das durch Läuse übertragene epidemische Rückfallfieber, *B. duttoni* das durch Zecken (*Ornithodoros moubata*) übertragene endemische Zeckenfieber beim Menschen. Es erkranken vor allem wildlebende Nager und Haustiere, Überträger sind ebenfalls Zecken.

B. theileri verursacht eine mild verlaufende Borreliose bei Rind und Pferd in Südafrika, Mittlerem Osten, Australien sowie Nord- und Südamerika. Sie wird in Afrika durch *Rhipicephalus evertsi* und *Boophilus decoloratus*, in Australien durch *Boophilus microplus* übertragen.

B. anserina ist der Erreger der Geflügelspirochaetose und wird vor allem durch die Lederzecke *A. persicus*, seltener auch durch *A. miniatus* und *A. reflexus* übertragen.

Die von BURGDORFER et al. 1982 neu entdeckte Borrelie (*B. burgdorferi*), die vor allem durch *Ixodes dammini* und in Europa durch *I. ricinus* übertragen wird, ist bei BERGEY (1984) noch nicht aufgeführt.

2.2.2 Morphologie und Beweglichkeit

Bei der Lyme-Spirochaete handelt es sich nach den Beschreibungen von JOHNSON et al. (1984) um ein spiralig geformtes Bakterium mit einem Durchmesser von 0,18-0,25 μm und eine Länge von 10 - 30 μm . Sechs bis acht Endoflagellen befinden sich rund um den Protoplasmazyylinder des Bakteriums zwischen Zytoplasma-Membran und der Zellwand. Mit Hilfe dieser Endoflagellen kann sich die Borrelie wellenförmig auch in hochviskösem Medium fortbewegen. Sie zeigt Vorwärtsbewegung, Faltbewegung sowie Rotation um die eigene Längsachse.

2.2.3 Färbbarkeit

Borrelien färben sich gram-negativ an und sind mit der Giemsa-Färbung sehr gut sichtbar. Sie lassen sich auch gut im Dunkelfeld darstellen (BERGEY 1984; BURGDORFER et al. 1984).

2.2.4 Anzüchtung in Kulturmedien

Die *Ixodes*-Borrelien lassen sich in künstlichen, sehr komplexen, flüssigen Nährmedien kultivieren. BARBOUR gelang es 1984, Borrelien aus dem Mitteldarm von adulten *I. dammini* im "fortified Kelly-Medium" anzuzüchten. Dieses Nährmedium war von KELLY (1971) entwickelt worden. Es wurde 1974 von STOENNER modifiziert und diente der Anzüchtung von *Borrelia hermsii*, eines nordamerikanischen Rückfallfieber-Erregers.

Als Grundlage für das abgewandelte Kelly-Medium (nach BARBOUR, STOENNER und KELLY BSK-Medium genannt) dient der CMRL 1066 Grundnährboden ohne Glutamin, der auf pH 7,6 eingestellt wird. Das Medium braucht unter anderem als Supplement hitzeinaktiviertes Kaninchenserum, das in einer Endkonzentration von 6% zugesetzt wird. Inkubiert wird bei 34 - 37°C. JOHNSON et al. (1984) verwenden eigene Modifizierungen, PREAC-MURSIC (1984) eine Kombination der Nährböden von STOENNER und BARBOUR.

2.3 Pathogenese der Borrelieninfektion

Die Differenzierung der pathogenen Potenzen von Borrelien ist noch nicht intensiv erforscht.

Die Pathogenität ist nach BECK (1985) auf Endotoxine zurückzuführen, die einen konstitutiven Bestandteil der Hülle gramnegativer Bakterien darstellen. Chemisch handelt es sich um Lipopolysaccharide. Diese besitzen ein breites Spektrum an pathologischen Eigenschaften, wie neurogene Effekte, Veränderungen des Blutbildes, Aktivierung von Makrophagen und Induktion der Interferonproduktion.

Die Ixodes-Borreliose ist durch Hautschädigung (E.c.m.) sowie durch sekundäre Manifestationen charakterisiert, die Herz, Nervensystem und Gelenke betreffen können.

Untersuchungen von NEUBERT (1984) deuten darauf hin, daß das E.c.m. als Initialstadium der Erkrankung durch eine anaerobe Mischinfektion mit weiteren bakteriellen Erregern verursacht werden könnte.

Es werden also verschiedene Organsysteme betroffen und die Manifestationen können innerhalb von Tagen oder erst nach Monaten auftreten. Es ist noch nicht bekannt, ob *B. burgdorferi* für längere Zeit in dem Organsystem persistiert, von dem die Krankheit ausgeht. Weiterhin ist ebenfalls ungeklärt, ob die bisweilen auftretenden Kreislaufsymptome durch den Erreger selbst oder durch zirkulierende Immunkomplexe verursacht werden. STEERE (1983) schließt einen Autoimmunprozeß bei genetischer Disposition nicht aus.

Um den Krankheitsmechanismus zu erforschen, zog BURGDORFER (1983) Kaninchen als Tiermodell heran. An diese wurden mit *B. burgdorferi* infizierte adulte *I. dammini* angesetzt. Um die Zeckenstichstelle rötete und verhärtete sich die Haut. Borrelien wurden aus dem Blut des infizierten Kaninchens zurückgewonnen. Das entzündliche Infiltrat reichte teilweise bis in das subkutane Fettgewebe und in die Skelettmuskulatur. Die vorherrschende Zellart waren Histiozyten, Plasmazellen wurden in weit geringerer Anzahl gefunden. Neutrophile und eosinophile Granulozyten fanden sich meist perivaskulär und in nekrotischen Arealen.

Auch bei humanen E.c.m.-Läsionen wies BERGER (1983) Plasmazellen und eosinophile Granulozyten nach, STEERE (1983) fand im Initialstadium der Erkrankung ebenfalls Histiozyten.

2.4 Borrelieninfektionen des Menschen

2.4.1 Epidemiologie

Das Erythema chronicum migrans ist bis jetzt in 19 Ländern auf 3 Kontinenten beobachtet worden.

Es existiert bis heute keine zusammenfassende Darstellung über die Verbreitung der E.c.m.-Krankheit in Europa. Ixodes ricinus wird als Hauptvektor für die Übertragung der Borreliose in Europa angesehen. HARD (1966) berichtete vom Auftreten eines E.c.m. nach einem Moskitostich in Skandinavien.

In Skandinavien tritt die Erkrankung in allen vier Ländern auf. Besonders viele Berichte liegen aus Schweden vor, neueste Veröffentlichungen stammen von ÅSBRINK (1985) und STIERNSTEDT (1985). SKÜLDENBERG berichtete 1983 vom Auftreten des ~~Bannwarth~~-Syndroms.

HOLLSTRÖM (1958) berichtete über den Erfolg der Penicillintherapie bei 77 Patienten, die in Stockholm behandelt worden waren. Auch aus Dänemark und Holland werden E.c.m.-Fälle beschrieben (GELBJERG-HANSEN 1945, MELSOM 1951).

GOLDIN (1978) beschrieb vereinzelte Krankheitsfälle aus dem Südwesten Englands.

DEGOS (1962) und DOUGADOS (1983) berichteten über das Auftreten des E.c.m. in Frankreich, auch in Spanien kamen Erkrankungen vor (URUNEULA 1977, GOMEZ 1983)

WEBER et al. veröffentlichten 1983 einen Bericht über die klinischen Symptome von 31 Patienten, die an E.c.m. erkrankt waren und zwischen 1975 und 1981 von zwei Münchener Hautärzten behandelt worden waren.

ACKERMANN berichtete 1984 über die serologischen Befunde bei sechs Patienten aus Köln.

WILSKE et al. (1985) fanden bei 16,5% von 242 gesunden Waldarbeitern aus Oberbayern Antikörper gegen B. burgdorferi.

Untersuchungen von SCHMIDT et al. (1985) ergaben bei 935 von 2955 Patienten positive Antikörpertiter gegen die Ixodes-Borrelie. In 289 der Fälle fehlten typische klinische Erscheinungen, bei weiteren 171 Erkrankten erlaubte das Krankheitsbild die Diagnose. Die erfaßten 1106 Infektionen stammten aus sämtlichen Regierungsbezirken der Bundesrepublik.

STEWART et al. (1982) beschrieben einen Krankheitsfall nahe Sydney, bei dem die betroffene Person von einem fliegenden Insekt gestochen worden war.

Aus Neuseeland liegen noch keine Berichte vor.

Die erste Fallbeschreibung eines E.c.m. aus den USA stammt von SCRIMENTI (1970). Erst 7 Jahre später berichteten STEERE et al. (1977) über das gehäufte Auftreten von Arthritis in der Ortschaft Lyme, Connecticut. Drei Gebiete werden von STEERE et al. (1983) als endemisch für Lyme-Disease angesehen : das Küstengebiet des Nordostens, Minnesota und Wisconsin im Mittelwesten; Kalifornien, das südliche Oregon und das westliche Nevada.

Diese Gebiete stehen nach Ansicht der Untersucher in engem Zusammenhang mit zwei bekannten Vektoren :
I. dammini im Nordosten und Mittelwesten, I. pacificus im Westen.

Es existiert eine Vielzahl von Einzelberichten über charakteristische Fallbeispiele (u.a. BENACH et al. 1983, STEERE et al. 1983, SHRESTA et al. 1985).

Der starke Anstieg der berichteten Erkrankungsfälle seit 1983 spiegelt das gestiegene Interesse und die verbesserten Nachweismethoden für die Lyme- oder E.m.-Krankheit wider.

Wegen des endemischen Auftretens der Lyme-Krankheit 1975 in einer ländlichen, walddreichen Gegend, der Häufung des Krankheitsbeginns im Sommer und Herbst sowie Identifikation der Hautveränderung als Erythema chronicum migrans war von Anfang an eine durch Arthropoden übertragene Infektion als Krankheitsursache angesehen worden.

Epidemiologische Studien von STEERE et al. (1978) zeigten, daß Schildzecken Überträger dieser Erkrankung darstellten. Ixodes scapularis wurde als Vektor angesehen.

Entomologen entdeckten jedoch doch morphologische Unterschiede zwischen den von STEERE im Norden der USA gesammelten Schildzecken und solchen, die aus dem Süden stammten. SPIELMANN et al. (1979) erkannte schließlich die im Norden gesammelten Zecken als neue Art an : *Ixodes dammini*.

NAVERSEN et al. (1978) berichteten von einem zweiten Vektor : *Ixodes pacificus*.

Im Anschluß an die Identifizierung der beiden Vektoren wurden *Spirochaeten* aus beiden Zeckenarten isoliert (BURGDORFER et al. 1982, STEERE et al. 1983).

Aus dem Mitteldarm von *I. dammini*, gesammelt auf Shelter Island, New York, einem Gebiet mit endemischem Auftreten der Lyme-Krankheit, konnte BURGDORFER (1982) bei 61% der gesammelten Zecken *Borrelia* nachweisen. Bei den aus Kalifornien stammenden *Ixodes pacificus* waren dagegen nur knapp 1% der untersuchten Zecken infiziert. Sowohl BOSLER (1984) als auch BURGDORFER et al. (1984) gelang es, die Lyme-*Spirochaete* aus adulten *I. dammini* sowie aus Nymphen dieser Art zu isolieren.

STEERE (1983) konnte im Gegensatz zu BOSLER (1983) *Spirochaeten* in nüchternen *I. dammini* nachweisen.

BURGDORFER (1984) wies transovariable Übertragung von *Borrelia* bei *I. ricinus* und *I. pacificus* nach.

Ixodes ricinus wird als Überträger der E.c.m.-Krankheit in Europa angesehen (ACKERMANN, 1984).

1982 wurden aus dem Nordwesten der Schweiz, Kanton Bern, mehrere Hundert adulte *I. ricinus* mit der Fahnenmethode gesammelt und von BURGDORFER et al. (1982) auf Spirochaeten untersucht. 36,3% der Zecken erwiesen sich als infiziert. Borrelien fanden sich nahezu ausschließlich im Mitteldarm der Zecken. Nur bei 3% aller Tiere wurden die Borrelien aus anderen inneren Organen und der Hämolymphe isoliert.

Aus Deutschland liegen noch keine epidemiologischen Studien über Befallsraten von Zecken mit Borrelien vor.

Lediglich ACKERMANN (1984) berichtete über die Untersuchung von Zecken aus Nordrhein-Westfalen, an denen sich Patienten mit Meningopolyneuritis infiziert hatten. Es gelang ihm, aus adulten *I. ricinus* und aus Nymphen Spirochaeten zu isolieren.

BURGER et al. (1985) sammelten 1985 über 1000 *I. ricinus* (988 Nymphen und 215 Adulte) aus Gebieten in Niederösterreich, Wien, Burgenland, Steiermark und Kärnten, alles Gebiete, aus denen Borrelien-Infektionen bekannt geworden sind. Bei der statistischen Abschätzung wurde eine mittlere Durchseuchung von *I. ricinus* mit 20% errechnet.

2.4.2 Klinisches Spektrum der Infektionen durch *B. burgdorferi*

Lyme-Krankheit wird von STANEK (1985) als "systemische, von Zecken übertragene Borrelieninfektion, die mit einer typischen Hautrötung (E.c.m.) beginnt (Stadium1), der neurologische oder kardiale Erkrankungen (Stadium2) sowie Gelenkserkrankungen folgen können(Stadium3)", definiert.

Folgende Erkrankungen und Krankheitssymptome werden zum klinischen Bild der Ixodes-Borrelioseninfektionen gezählt:

Allgemeinsymptome

Sie treten vor allem im Frühstadium der Erkrankung auf und sind gekennzeichnet durch Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, subfebrile Temperaturen, Schwellung regionaler Lymphknoten sowie Photophobie, auch über Symptome des Gastrointestinaltraktes wie Übelkeit und Erbrechen wird berichtet (WEBER, 1983).

Hauterkrankungen

Erythema chronicum migrans (E.C.M.)
Lymphadenosis cutis benigna (L.C.B.)
Acrodermatitis chronica atrophicans (A.C.A.)

Neurologische Erkrankungen

Meningopolyneuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth
Polyneuritis
Hirnnerven-Radiculitis (meist N. facialis)
Meningitis

KRISTOFERITSCH et al. (1983) grenzen die Borreliosen-Meningitis klar von der FSME und anderen chronischen Meningitiden ab; kennzeichnend für die durch Spirochaeten hervorgerufene Hirnhautentzündung sei die über Monate anhaltende Ig M-Erhöhung.

2.4.3 Diagnosemöglichkeiten

Während die Diagnose der klassischen Erythema-migrans-Krankheit klinisch gestellt werden kann, werden mit Hilfe der Labordiagnostik auch atypische Verlaufsformen erfaßt, besonders die, bei denen das E.C.M. nicht ausgeprägt war oder übersehen wurde, so daß nur die Spätkomplikationen diagnostiziert werden konnten.

Serologische Diagnostik

Sie erfolgt durch den Nachweis von spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern gegen die Ixodes-dammini- und Ixodes-ricinus-Spirochaete mit Hilfe des IFAT (indirekter Fluoreszenzantikörpertest) oder des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Der IFAT wird vor allem in der Routinediagnostik angewendet (WILSKE et al., 1984).

In zwei getrennten Studien wurde ein ELISA entwickelt, der den IFAT an Spezifität und Sensitivität teilweise zu übertreffen scheint (CRAFT et al. 1984, RUSSELL et al. 1984).

Die Sensitivität variiert nach den Beobachtungen dieser Untersucher mit dem Stadium der Erkrankung. Steht nur eine Serumprobe zur Verfügung, so haben 50% der Patienten oder weniger positive Titer im Stadium des E.C.M., währenddessen in komplizierten Fällen (Patienten mit Arthritis, neurologischen oder kardialen Symptomen) nahezu alle Patienten positive Titer aufweisen.

ACKERMANN et al. (1984) wies im Frühstadium der Erkrankung (E.C.M.) bei 20% der Fälle erhöhte IgM-Titer nach, die zwischen der dritten und der sechsten Woche nach Krankheitsbeginn ihren höchsten Wert erreichten. Beim Auftreten von Spätkomplikationen konnte er bei 50%, STEERE (1985) sogar bei 94% aller Patienten positive Titerwerte für IgG nachweisen. Der positive Grenzwert liegt für IgG bei einer Verdünnung von 1:64, für IgM bei 1:128 (WILSKE 1985).

2.4.4 Therapie

Die kausale Therapie liegt in der Anwendung von Antibiotika. Die Behandlung des E.C.M. war in Europa schon lange vor dem Nachweis eines infektiösen Agens bekannt (HOLLSTRÖM 1958, WEBER 1974). 1980 veröffentlichten STEERE et al. die erste Studie für die Wirksamkeit von Penicillin bei Lyme-Krankheit. 1983 konnte STEERE nachweisen, daß bei frühzeitiger Tetracyclin-Therapie im Gegensatz zu Penicillin keine schweren Spätmanifestationen wie Arthritis oder Meningopolyneuritis auftraten. Außerdem empfiehlt er bei Spätmanifestationen systemische Anwendung von Corticosteroiden.

Mittlerweise existieren von verschiedenen Autoren

Vorschläge für antibiotische Therapie (u.a. von STEERE 1983, WEBER 1983, KRISTOFERITSCH 1983, WÖRTH 1985).

2.5 Borrelieninfectionen der Wild- und Hausäugetiere

Alle Blutspirochaeten werden von blutsaugenden Arthropoden auf den Vertebraten beim Saugakt oder in engem Zusammenhang mit diesem übertragen. Borrelien sind bis auf wenige Ausnahmen tiergetragen, also Erreger von Anthropozoonosen. Auch die hier interessierenden "neuen" Borrelien sind ebenfalls Zeckensymbionten im Sinne HOOGSTRAALS (1979). Ihre Arterhaltung und lokale Verbreitungstradition ist auf ein dauerndes Zirkulieren in Basiszyklen zwischen Vertebraten und Arthropoden gebunden. Der Mensch als Fehlwirt ist verbreitungstechnisch gesehen dabei sowohl für die Spirochaeten, wie für die Zeckenwirte eine verzichtbare Größe. Er kann kein fester Bestandteil eines natürlichen Basiszyklus sein, weil auf ihm nur selten eine Zecke, gleich welchen Entwicklungsstadiums, den Saugakt ungestört beenden kann, der Erreger also beim Menschen in eine Sackgasse gerät.

Im vorliegenden Falle sind dreiwirtige Schildzecken der Gattung Ixodes Hauptwirte für die Borrelien. Damit stehen alle Wild- und Hausäugetiere, die von ihnen regelmäßig als Blutspender frequentiert werden, sozusagen automatisch im Verdacht, potentielle Wirte auch für die Borrelien zu sein, sofern diese beim Saugakt übertragen werden. Zahlreiche Naturherdanalysen haben in Nordamerika diesen Verdacht vielfach bestätigt. Mit 35 - 61% wird dort die Befallsrate adulter Ixodes dammini genannt (BURGDORFER et al. 1982, ANDERSON et al. 1983).

Nachgewiesen wurden sowohl stets größere Anteile der natürlichen Wildsäugerpopulationen, die positive Serotiter gegen *B. burgdorferi* aufwiesen, sowie Peripherblutkulturen und Kulturen aus den inneren Organen der Tiere, die die *Spirochaete* enthielten. Mikroskopisch sichtbare *Spirochaetämien* wurden allerdings nie beobachtet.

Die Borrelienstämme, die aus Zecken und Wildsäugern isoliert worden waren, stimmten serologisch und morphologisch und kulturell in ihren Eigenschaften mit denen von erkrankten Menschen überein (ANDERSON et al. 1985). Wie immer bei solchen Naturherden eines potentiell pathogenen Infektionserregers werden charakteristisch zusammengesetzte Trägersysteme unter den lokalen Wildvertebraten vermutet, an denen auch Haustiere teilnehmen können.

Dieser Teil der Epidemiologie kann für Europa zwar im Prinzip oder Grundriß, aber nicht "wörtlich" übernommen werden. In den tragenden Ökosystemen sind die einander entsprechenden ökologischen Nischen auf beiden Seiten des Ozeans mit jeweils andersartigen Tieren besetzt, die sich zoosystematisch noch nicht einmal nahe stehen müssen. Das gilt sowohl für Säugetiere als auch für Vögel. Damit ist klar, daß die immer zahlreicher werdenden Beobachtungserfahrungen der Neuen Welt über das Vorkommen von *B. burgdorferi* in den die *Spirochaete* natürlich tragenden Systemen für uns nur die Funktion eines Stimulus hat, die Umweltverhältnisse in Europa entsprechend zu überprüfen.

Es sind die hauptsächlich betroffenen Tierarten herauszustellen und auf der Artebene klar zu benennen. Es wird versucht, mit dieser Arbeit einen Anfang zu machen, welcher natürlich von dem ausgehen sollte, was die amerikanischen Experten an Prinzipiellem erarbeitet haben.

Die Entdeckung von *Ixodes dammini* als Hauptwirt und Überträger der Schildzecken-Borreliose des Menschen (E.C.M- oder Lyme-Krankheit) durch BURGDORFER et al. 1982 ging in den USA die Aufklärung der menschlichen *Babesia microti*-Infektion (Nantucket's-Fieber) voraus. Sie nutzt die gleiche Zeckenart als Hauptvektor und schien daher geographisch ähnlich verbreitet. Seit der Aufklärung der Ätiologie des Felsengebirgsfiebers hat die Zeckenforschung in den USA keine ähnlich starke Herausforderung mehr erlebt. Die zweifache Stimulierung durch Nantucket's Fieber und Lyme-Krankheit führte zu einer regelrechten Renaissance der Forschung in Zecken-ökologie und -xenologie. Schon 1980 hatten CAREY et al. bei ihren Felduntersuchungen in Connecticut auf die wesentlichen Wirte für *I. dammini* hingewiesen. Sie sammelten 9000 Zecken an 22 Wirtsarten, hauptsächlich kleinen Wildsäugetieren und stellten die am häufigsten befallenen Arten heraus : *Peromyscus leucopus* und *Tamias striatus* für die Jugendstadien, sowie *Odocoileus virginianus* als Imaginalwirt. Die nachtaktive weißfüßige Hirschmaus entspricht in Habitus, Verhalten, Aktionsradius und Geländenutzung etwa unseren *Apodemus*-Arten. *Peromyscus*- und *Apodemus*arten sind die jeweils häufigsten Kleinsäuger hier bzw. in den USA. Die Gattung *Peromyscus* gehört zur Familie Cricetidae, ohne daß sie mit den Hamsterartigen außer einer typischen Bezahnung allzuviel gemeinsam haben. Das gestreifte Borkenhörnchen

oder Chipmuck ist eines der populärsten tagaktiven Nagetiere Nordamerikas. Es kann beachtliche Flächendichten erreichen. Der virginische Weißwedelhirsch ist als Zeckenwirt eine ähnlich tragende Figur wie bei uns das Rehwild. Beide kleinen Wildwiederkäuer ersetzen sich in dieser Hinsicht auf der einen wie der anderen Seite des Ozeans. MAGNARELLI et al. (1984) untersuchten 323 Weißwedelhirsche auf Zeckenbesatz und prüften die Seren auf Borrelien-Antikörper im IFAT mit Spitzentiter von 1:4096. 60% der Hirsche waren auch nach MAIN et al. (1984) Zeckenträger, wobei der Befallsindex etwas höher als 16 pro Tier lag. WILSON et al. (1984) fanden aber keine Reduktion der Zecken-Flächendichte nach rigorosem Abschluß der Hirsche als den vermeintlich schwächsten Gliedern der Zeckenbiologie. Andere Imaginalwirte können also jederzeit gleichwertig einspringen.

PIESMAN und SPIELMAN unterstrichen schon 1979, daß die immaturen Stadien von *I. dammini*, ähnlich wie die von *I. ricinus* in Europa, über ein breiteres Spektrum an Wirtstieren verfügen als andere Zeckenarten, daß aber immer *Peromyscus leucopus* im Vordergrund stehe.

Auf besondere Wirte wiesen ANDERSON und MAGNARELLI (1984) hin. Sie isolierten kulturell Borrelien auch aus dem Blut von 6 örtlich häufigen Singvogelarten und bestätigten auf diese Weise Spirochaetämien, an denen sich auch Vögel befallende Zecken infizieren könnten.

Die Ixodes-Borreliose des Menschen erweiterte und veränderte in den USA die bekannten Verbreitungsschwerpunkte der Tick-borne Diseases gegenüber denen des Felsengebirgs- und Nantucket's-Fiebers: Es sind nach Bosler et al. (1983)

die Küstengebiete des Nordostens, der Mittelwesten sowie Teile Kaliforniens und Oregons im Westen. Dieses Areal ist im Osten durch die Verbreitung von *I. dammini*, im Westen durch die von *I. pacificus* hinreichend abgedeckt. Die unentbehrlichen kleinen Wildwirbeltiere sind überall in hinreichender Zahl und Artzusammensetzung vorhanden. Gleichwohl erfaßte die systematische Analyse der Basiszyklen von *B. burgdorferi* in den USA noch mehr als ein halbes Dutzend weiterer Zeckenarten und ihrer warmblütigen bevorzugten Wirte. Dadurch fanden vielleicht verstreute Einzelfälle von menschlicher Lyme-Krankheit, etwa in Utah und Pennsylvania, ihre Erklärung. Die nord-amerikanischen *B.-burgdorferi*-Stämme sind offenbar nicht nur ohne Wirbeltierspezifität, sie sind auch nicht auf wenige *Ixodes*-Arten als Arthropodenwirte angewiesen. Auch in *Amblyomma americanum* (SCHULZE et al. 1984), *Dermacentor variabilis* (ANDERSON et al. 1985), *D. albipictus* (SCHULZE et al. 1984) und *Haemaphysalis leporispalustris* (ANDERSON u. MAGNARELLI, 1984) wurden Borrelien entdeckt.

Diese Sachlage läßt vermuten, daß auch domestizierte Tiere, soweit die Haltungsbedingungen es ihnen gestatten, an den Borrelien-Basiszyklen mehr oder minder regelmäßig teilnehmen. Die ersten Haustiere, die in Nordamerika mit *Borrelia burgdorferi* infiziert gefunden wurden, waren Hunde. LISSMAN et al. (1984) beschrieben als erste eine Lyme-Arthritis bei einem 3 Jahre alten Dobermann aus der New Yorker Gegend. Mit einem Serotiter um 1:256 und einer positiven Blutkultur war die Ursache der schmerzhaften Gelenkentzündung bei diesem Tier aufgeklärt.

Es konnte mit antibiotischer Behandlung geheilt werden.

MAGNARELLI et al. (1985) berichteten ein Jahr später über das Ergebnis von Serienuntersuchungen von Hundeseren auf Antikörper gegen Borrelien mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz. 52 (25%) von insgesamt 210 Tieren reagierten deutlich positiv. Sie stammten alle aus Gebieten, in denen die Lyme-Krankheit des Menschen endemisch auftritt. Hunde sind häufig Zecken-träger und können wahrscheinlich in der Ökologie von *B. burgdorferi* eine gewisse Rolle spielen. Die Entdeckung von Antikörpern bei großen und kleinen Wiederkäuern in den USA dürfte nur noch eine Frage der Zeit sein. Inzwischen ist das Ergebnis eines ähnlichen Sero-surveys, wie er für Hunde vorliegt, von Pferden publiziert. 12 (24%) von 50 unwillkürlich ausgewählten Tieren aus einem endemischen Bezirk Connecticuts wiesen Sero-titer gegen *B. burgdorferi* auf (MARCUS 1985). Kreuzreaktionen mit Leptospiren wurden, wie auch bei den Hunden, nicht beobachtet.

Die Konturen der Wirbeltiernutzung durch *Ixodes-Borrelien* zeichnen sich für Nordamerika von Tag zu Tag deutlicher ab.

Aus Europa ist in dieser Hinsicht noch nichts bekannt geworden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

Die Infektion von Mensch und Haustier hat einen breiten ökologischen Hintergrund, in dem vor allem große und kleine Wildsäugetiere die Rolle der Basisreservoirs übernehmen. Durch die Untersuchung von *I. ricinus* auf Borrelien, planmäßig gesammelt vom Rehwild, sowie von Kleinsäugetieren aus bekannten endemischen Herden Bayerns auf serologische Konsequenzen des Kontaktes mit *Ixodes*-Borrelien werden Hinweise auf die Vektorkapazität dieser Tierarten erwartet.

Da rheumatoide Gelenkerkrankungen unklarer Genese sowie chronische Hautveränderungen vor allem beim Hund zunehmend diagnostiziert werden, über eventuelle Zusammenhänge mit Borrelieninfektionen in Europa noch nichts bekannt ist, erstrecken sich die nachfolgenden Untersuchungen auch auf diese Tierart. Schließlich führte die Verfügbarkeit von 66 Rinderseren, sowie die Tatsache, daß noch kein Bericht über das Vorkommen von Antikörpern gegen *Ixodes-ricinus*-Borrelien existiert, zur serologischen Stichprobenuntersuchung auch bei dieser Tierart.

3.1.1 Zecken

Von Mai bis einschließlich Dezember 1985 wurden 17 erlegte Rehböcke sowie 9 Rehgeißen auf Zecken untersucht. Alle Tiere stammten aus bewaldeten Gebieten des Landkreises Neustadt/Aisch - Bad Windsheim (Abb.1).

- 25 -



Das erlegte Rehwild (*Cervus capreolus*, Familie Cervidae) wurde so schnell wie möglich, spätestens jedoch 5 Stunden post mortem 30 Minuten lang auf Zecken in Haut und Haarkleid untersucht. Der Prozentsatz an Zecken, die bereits innerhalb dieser kurzen Zeitspanne abgefallen und für die Untersuchung verloren waren, konnte deshalb vernachlässigt werden.

Die Mehrzahl der männlichen adulten Zecken wurde entweder herumkrabbelnd im Fell der Tiere oder in Kopulation mit Weibchen gefunden. Nur wenige hafteten in der Haut der Wirte. Dagegen waren die weiblichen Zecken zum Zeitpunkt des Absammelns noch in der Haut der Rehe verankert.

Die noch in der Haut haftenden Zecken wurden mit einer Pinzette unter Schonung der Mundorgane vorsichtig herausgedreht.

Die gesammelten Zecken wurden bis zur Untersuchung in Rollrandgläschen (Höhe 43mm, Durchmesser 30mm), die mit einem Wattestopfen verschlossen wurden, aufbewahrt. In die Gläschen wurde befeuchteter Zellstoff gegeben. Die Aufbewahrung bis zur Präparation und Untersuchung erfolgte bei Zimmertemperatur.

3.1.2 Präparation der Zecken

Die zu untersuchenden 434 Zecken wurden je drei Minuten in sterilem Aquq dest., anschließend in 70%igem Äthylalkohol und zuletzt in gepufferte Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Zur Präparation wurden die Zecken mit Hilfe einer erhitzten, sterilen Pinzette an den Beinpaaren auf mit Paraffin beschichteten Platten fixiert.

Präparation :

An der Basis capituli beginnend, wurde die Cutincuticula entlang der Körperperipherie mit einem feinen Skalpell aufgeschnitten und zur Seite geklappt.

Abbildung 2 veranschaulicht die Schnittführung bei weiblichen und männlichen adulten *I. ricinus*.

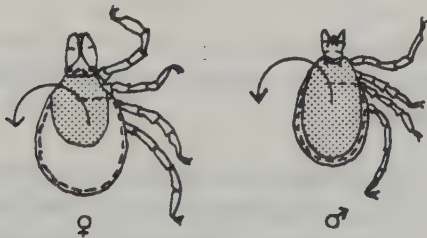


Abbildung 2 : Schnittführung zur Freilegung des Zecken-
darmes

Die Präparation der Tiere erfolgte unter dem Stereomikroskop (Wild, Heerbrugg W 3) bei 400facher Vergrößerung.

Nachdem der Zeckendarm auf diese Weise freigelegt war, wurde mit steriler Pipette ein Tropfen BSK II-Medium (abgewandelt nach PREAC-MURSIC) aufgetropft. Eine Hälfte des Darmes wurde auf einen mit Alkohol gereinigten Objektträger ausgestrichen. Die ca. 0,5 cm große Auftragsfläche pro Darm war mit einem Diamantstift eingegrenzt worden.

Die andere Hälfte des Mitteldarmes wurde zur kulturellen Isolierung von eventuell im Darm enthaltenen Borrelien in Eppendorf-Reaktionsgefäße verbracht, die BSK II-Medium enthielten.

Die Darmausstrichpräparate wurden mindestens eine Stunde an der Luft getrocknet.

3.1.3 Untersuchung der Präparate auf Borrelien mit dem direkten Immunfluoreszenztest

Der direkte Immunfluoreszenztest wurde mit freundlicher Hilfe von B.Wilske im Max-von-Pettenkofer-Institut München durchgeführt.

Reagenzien : 1. Gepufferte Kochsalzlösung pH 7,4
2. Anti-Lyme-Spirochaeten-FITC-Konjugat
(Nr. 436/3, bei -70°C aufbewahrt, hergestellt im Max-von-Pettenkofer-Institut)

Die Ausstriche wurden 20 min in 96%igem Methanol fixiert und anschließend 10 min an der Luft getrocknet. Je Auftragsstelle wurden 15 µl Konjugat mit der Eppendorfpipette aufgetropft und mit abgeflammter Platinöse über die ganze Auftragsfläche verteilt.

Anschließend inkubierte man die Objektträger bei 37°C für 30 min im Brutschrank.

Danach wurden sie 3mal 5 min in gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,4) gewaschen.

Nach dem 3. Bad wurden die Objektträger aus der Waschküvette genommen, vorsichtig zwischen Filterpapier getrocknet und mit einem Tropfen phosphatgepuffertem Glycerin (pH 7,4) eingedeckelt.

Die Ablesung der Präparate erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leitz, Laborlux 12) : Objektiv 40, Okular 10, Filter 1.

3.1.4 Blutseren

Untersucht wurden Serumproben von Mäusen, Hunden und Rindern.

3.1.4.1 Mäuseseren

Als Untersuchungsmaterial diente das Blut von 66 Mäusen, die sich aufgrund der geographischen Herkunft in zwei Gruppen unterteilen lassen :

Gruppe 1

Kleinsäugetiere, die am 18. und 19. Juni 1985 mit Hilfe von Lebendfallen aus dem Schwanheimer Unterwald bei Frankfurt/Main gefangen worden waren. Ziel war die Beschaffung und Untersuchung von Mäusen, die dem gleichen Gebiet entstammten, aus dem 1984 *Borrelia spec.* Schwanheim aus *Ixodes ricinus*-Larven isoliert worden war, um eventuell auch erstmals in Europa endemische Herde für *Ixodes-Borrelien* bei Kleinsäugetern nachzuweisen.

Fangergebnis : 33 Rötelmäuse (*Clethrionomys glareolus*)
10 Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*)

Der Lebendfang wurde in guter Verfassung nach München gebracht und das Geschlecht der Tiere bestimmt.

Zwei Wochen später wurden die Mäuse nach Betäubung mit Äther aus dem retrobulbären Venenplexus entblutet. Das durch Zentrifugieren gewonnene Serum wurde bis zur Untersuchung zu je 50 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

Gruppe 2

Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Mäuse, die im Juli 1985 mit Hilfe von Lebendfallen aus dem Grafrather Forstgarten gefangen worden waren. Auch diese Kleinsäuger kommen aus einem für die einheimischen Ixodes-Borrelien endemischen Gebiet, KRAMPTZ war es 1976 gelungen, aus Ixodes ricinus-Nymphen, die der gleichen Gegend entstammten, einen Borrelienstamm (*B. spec. Grafrath*) zu isolieren.

Fangergebnis : 11 Rötelmäuse (*Clethrionomys glareolus*)
7 Waldmäuse (*Apodemus sylvaticus*)
3 Feldmäuse (*Microtus arvalis*)
2 Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*)

Diese Gruppe von Kleinsäugetieren wurde ebenfalls nach München gebracht und nach zwei Wochen entblutet. Die Aufbewahrung der Seren erfolgte in der gleichen Weise wie bei Gruppe 1.

3.4.1.2 Hundeseren

Als Ausgangsmaterial diente das Blut von 72 Hunden, das im Rahmen dieser Stichprobenuntersuchung mit Hilfe des IFAT auf Antikörper gegen die 12 zur Verfügung stehenden Borreliensämme getestet wurde.

11 Tiere stammten aus dem Landkreis Neustadt/Aisch-Bad Windsheim und waren zum Zeitpunkt dieser Untersuchung im Allgemeinbefinden gestört, die Krankheitsursache hatte jedoch von den behandelnden Tierärzten nicht geklärt werden können.

Die 66 restlichen Seren stammten von Tieren, die im Institut für Vergl. Tropenmedizin und Parasitologie, München auf Leishmaniose oder Toxoplasmose getestet worden waren und dabei negativ reagiert hatten. Die Hunde stammten zum größten Teil aus dem Münchener Raum.

3.1.4.3 Rinderseren

Untersucht wurde das Blut von 66 Rindern, das mir freundlicherweise von Herrn S. Brem, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern zur Verfügung gestellt worden war. Die Rasse und geographische Herkunft der Tiere, sowie Haltungsart (aufgestallt oder im Sommer Weidegang) wurde ermittelt.

Es wurden Rinderseren aus 20 Beständen untersucht. Die Tiere stammten aus folgenden Landkreisen : Weilheim-Schongau, Bad Tölz-Wolfratshausen, Aichach-Friedberg, Neu-Ulm, Oberallgäu, Unterallgäu, Dillingen, Günzburg, Rosenheim, Dachau und Erding.

In 11 Beständen hatten die Rinder im Sommer Weidegang, in den restlichen 9 dagegen waren die Tiere gantzäßig aufgestallt. Die Rinder gehörten den Rassen Fleckvieh, Braunvieh und Schwarzbunt an.

24 der 66 untersuchten Tiere (36,36%) hatten zuvor in der serologischen Untersuchung, die vom Landesuntersuchungsamt durchgeführt worden war, gegen Leptospiren positiv reagiert (Titerhöhe $\geq$ 1:400).

3.1.5 Antigengewinnung für den IFAT

Zur Herstellung von Antigenen verschiedener Borreliensämme konnte auf eine Reihe von Stämmen zurückgegriffen werden, die sich bereits in der Sammlung des Institutes befanden und als Stabilate in tiefgefrorenem Zustand bei -80°C aufbewahrt wurden.

Neu hinzu kam ein Stamm aus Österreich, der über mehrere Wochen passagiert wurde. Als Empfängertiere dienten Gerbils (*Meriones unguiculatus*). In Tabelle 1 sind die verwendeten Stämme einzeln aufgeführt.

Außer Gerbils wurden weiße NMRI-Mäuse und Rötelmäuse für die Antigenherstellung verwendet.

Alle Tiere stammten aus der Zucht des Institutes. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen gehalten. Gefüttert wurden sie mit Altromin-Mäusestandarddiät, Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Art	Stamm	tier. Herkunft	geograph. Herkunft	Datum der Erstisolierung	Erstisolierung durch
Borrelia tillae	Laborstamm	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Borrelia duttoni	"	"	"	"	"
Borrelia recurrentis	"	"	"	"	"
B. crocidurae	16.803	Ornithodoros eraticus	Giza Imbaba Abu Galip (Ägypten)	1985	KRAMPLTZ
"	16.808	"	G.i. el Hagir	1985	"
"	16.809	"	G.i. el Minshat	1985	"
"	16.811	"	G.i. el Wardon	1985	"
"	16.813	"	G.i. el Aiyat	1985	"
"	16.815	"	G.i. el Hagir	1985	"
Borrelia spec. Schwanheim	Schwanheim 148	Ixodes ricinus Larven	Frankfurt/Main Schwanheim	1984	"
Borrelia spec. Grafrath	Grafrath 75	Ixodes ricinus Nymphen	Grafrath / Reithermos	1976	"
Borrelia spec. Österreich	Österreich 190	Ixodes ricinus Adult	Wolkersdorf Weinviertel (Österreich)	1985	STANEK

Tabelle 1: Einordnung der im IFAT verwendeten Borrelia spp.
nach tierischer und geografischer Herkunft, sowie
Erstisolierung

Für die Infektion wurden adulte Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet, das durchschnittliche Gewicht der Gerbils betrug 50g, das der Rötel- und der weißen NMRI-Maus ca. 20g.

Zur Stabilatherstellung wurden die Mäuse und Gerbils bei maximaler Parasitämie (Dichtekontrolle mittels dickem Tropfen, Anfärbung der Borrelien nach Giemsa, Betrachtung unter dem Mikroskop der Firma Wild, Heerbrugg, Nr. M20 24882, Okular 10, Objektiv 50, Ölimmersion) aus dem retrobulbären Venenplexus entblutet.

Die Tiere wurden dazu mit Äther narkotisiert, das Blut mit einer Pasteurpipette entnommen.

Nach Zusatz von Heparin-Natrium (Vetren^D) zur Gerinnungshemmung wurde dem entnommenen Blut die gleiche Menge glycerinhaltiger NaCl-Lösung (70% physiol. NaCl-Lösung und 30% Glycerin) zugegeben.

Je 1 ml Blut-Glycerin-Gemisch wurde in 1,2 ml fassende Glasampullen (Firma Wheaton, New Jersey) gefüllt, welche anschließend zugeschmolzen und beschriftet wurden. Mit einer automatischen Gefriervorrichtung (Fa. Cryoson, Microprocessor Controlled Freezing System) wurde die Temperatur um 1°C/min verringert, bis -40°C erreicht waren.

Aufbewahrt wurden die Ampullen bei -80°C im Gefrierschrank.

Für die Infektion wurden die Stabilate unter Leitungswasser vorsichtig aufgetaut. 0,75 ml des Blut-Glycerin-Gemisches wurde den Tieren i.p. injiziert, 0,25 ml s.c. verimpft.

Um eine möglichst hohe Spirochätämie zu erreichen, wurden die Tiere ca. eine Woche vor der experimentellen Infektion splenektomiert.

Die Tiere wurden mit Nembutal-(Pentobarbital Natrium) i.p. narkotisiert. Eine ausreichende Narkose wurde mit 0,05 ml in 0,5 ml isotonischer Kochsalzlösung pro 20 g Körpergewicht erreicht.

Anschließend wurde das Operationsfeld rasiert. Die Rasur reichte von der Bauchmitte (Linea alba) bis zur Rückenmitte, von den Hintergliedmaßen bis zu den Vordergliedmaßen.

Die Tiere wurden mit Leukoplaststreifen an den gestreckten Extremitäten auf dem Operationstisch fixiert.

Das rasierte Operationsfeld wurde mit Alkohol entfettet und gesäubert. Die Bauchhöhle wurde mit einem ca. 1 cm langen Schnitt, der fingerbreit unterhalb des linken Rippenbogens gelegt wurde, eröffnet.

Die Milz wurde behutsam extraperitoneal verlagert, die Gefäße mit Arterienklemmen ligiert. Danach wurde die Milz mit Hilfe eines Thermokauters am Hilus von den Gefäßen und Milzbändern abgetrennt, die Gefäßstümpfe thermokauterisiert und nach Kontrolle der Blutstillung mit dem Netz zurückverlagert.

Haut und Bauchmuskulatur wurden mit drei Wichelklammern aneinander adaptiert, das Peritoneum blieb unversorgt.

Zur Überprüfung des Verlaufes der Spirochätämie wurde täglich ein Tropfen Blut aus der Schwanzspitze der Tiere auf einen Objektträger gebracht und der Tropfen mit Hilfe einer Ecke eines zweiten Objektträgers durch kreisende Bewegungen auf die Größe eines Pfennigstückes ausgebreitet. Anschließend wurde der sogenannte "Dicke Tropfen" luftgetrocknet.

Die fünfprozentige Giemsalösung (Firma Merck, Nr.9204) wurde nun ohne vorherige Alkoholfixierung des dicken Tropfens in einer Menge von 4 ml pro Objektträger aufgegossen.

Als Lösungsmittel für die Färbelösung nach Giemsa diente Pufferwasser nach Sörensen (pH 7,2).

Die Objektträger wurden 40 Minuten gefärbt, mit Leitungswasser vorsichtig abgespült und sorgfältig luftgetrocknet.

Zur Antigenherstellung wurden die Tiere bei geeigneter Spirochätenkonzentration im Schwanzblut (ca. 3.-4. Tag post infectionem, nach Giemsa gefärbter dicker Tropfen enthält 10-20 Borrelien pro Gesichtsfeld bei 500facher Vergrößerung) aus dem retrobulbären Venenplexus entblutet. Abbildung 3 zeigt *Borrelia spec. Grafrath* im Schwanzvenenblut eines entmilzten Gerbils bei 500facher Vergrößerung. Ein Teil des borrelienhaltigen Blutes wurde auf weitere Tiere passagiert, da Passagetiere meist einen zügigeren Infektionsverlauf und eine höhere Spirochätämie aufweisen.

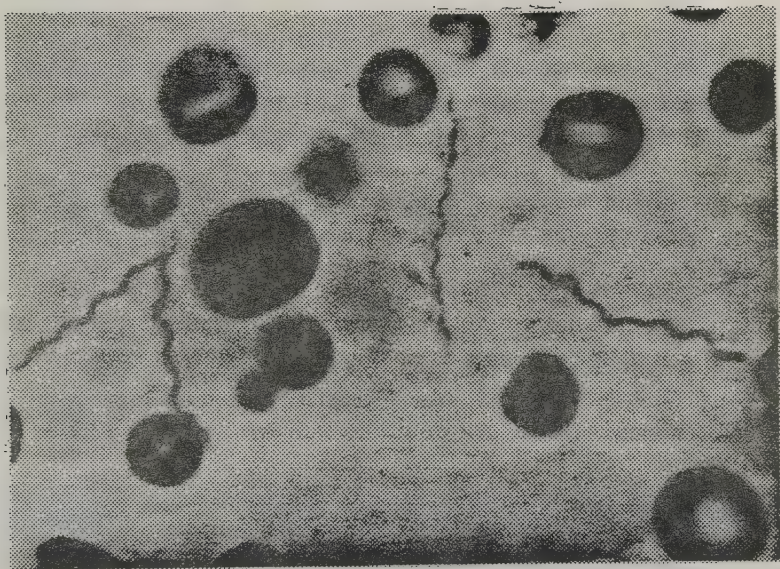


Abbildung 3 : *Borrelia spec. Grafrath* im Blut-
ausstrich
4 Tage p.i., 500fache Vergrößerung

Das Blut wurde in ein Zentrifugenröhrchen verbracht und
3 Minuten bei 300 U/min zentrifugiert (Hettich Roto
Silenta II Zentrifuge).

Der Überstand, bestehend aus Plasma und Leukozytenschicht,
wurde mit einer Pasteurpipette abgehebert.

Das Sediment, welches die Erythrozyten und den größten Teil der Borrelien enthielt, wurde in PBS resuspendiert (1:3). Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Oberstand wieder abgenommen. Der gewonnene Oberstand enthielt oft schon genügend Borrelien für den IFAT und wurde als Antigen des ersten Waschens bezeichnet.

Um möglichst viel Antigen für den IFAT herstellen zu können, wurde der Vorgang des Waschens noch ein- bis zweimal wiederholt.

Plasma mit Leukozytenschicht, Antigen des 1., 2. bzw. 3. Waschens wurden mit Hilfe der Schnellfärbung "Diff Quick^R" (Fa. Merz Dade) auf Borreliendichte untersucht.

Zur Herstellung der Antigenpräparate wurde die geeignete Borreliensuspension (ca. 10-20 Borrelien pro Gesichtsfeld) auf farbig beschichtete Objektträger (Fa. Hölzel, mit 12 Auftragsstellen) aufgetragen.

Nach Lufttrocknung über Nacht wurden die mit Antigen beschichteten Objektträger zu je 8 Stück in Pergamentpapier eingewickelt, beschriftet, unter Zugabe von Kieselgel als Feuchtigkeitsindikator (Fa. Merck) in Plastiktüten eingeschweißt und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.6 Durchführung des IPAT

Das positive und negative Kontrollserum, das zur Sicherung des Testes immer mitgeführt wurde, wurde freundlicherweise vom Max-von-Pettenkofer-Institut zur Verfügung gestellt. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um ein vom Kaninchen stammendes Serum. Das Tier war gegen *Borrelia burgdorferi* Stamm 31 immunisiert worden. Das Serum hatte vor dem Einfrieren einen Antikörpertiter gegen den *Borrelia-burgdorferi*-Stamm von 1:16000, war aber vor der Verwendung schon mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren worden.

Das negative Kontrollserum stammte ebenfalls von einem Kaninchen aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut.

Die Antigenpräparate wurden sowohl im fixierten als auch im unfixierten Zustand getestet.

Folgende Fixierungsverfahren wurden getestet :

1. Fixierung in Methanol für 10 Minuten
2. Fixierung in Aceton/Äthanol,
davan 5 Minuten in Aceton, eine Minute in Äthanol
3. Fixierung in Aceton für 5 Minuten

Die Präparate wurden anschließend luftgetrocknet.

Es ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen fixierten und unfixierten Präparaten. Bei Fixierung mit Methanol und Aceton/Äthanol haftete der dem Konjugat zur weitgehenden Vermeidung von unspezifischen Fluoreszenzen zugegebene Farbstoff auf dem Antigen und erschwerte damit die Beobachtung der Fluoreszenz.

Als brauchbar erwies sich das fünfminütige Fixieren in Aceton. Es war nur zu beachten, daß zur Fixierung mit Aceton geeignete Objektträger verwendet wurden, da sich bei nicht acetonefesten Objektträgern der Farbstoff zur Markierung der 12 Auftragspunkte beim Berühren leicht ablöst.

Fixierte Objektträger erwiesen sich geeigneter als unfixierte, da bei den unfixierten das aufgetragene Material beim mehrmaligen Waschen leicht abschwamm und damit die betroffenen Auftragsstellen für die Beurteilung unbrauchbar werden ließ.

Zur Durchführung des IFAT wurden die Antigenpräparate eine Stunde vor Gebrauch bei Zimmertemperatur aufgetaut, anschließend 5 Minuten in Aceton fixiert und luftgetrocknet. Die Verdünnung der zu untersuchenden Seren erfolgte auf Mikrotiterplatten der Firma Greiner.

Die Platten wurden beschriftet, als Verdünnungsmedium für die Seren diente ein Phosphatpuffer (pH 8, 1:20 verdünntes Konzentrat, Fa. Behring).

In Reihe H der Platten wurden 150 µl Puffer als Vorlage eingefüllt, in die Reihen A-G je 50 µl. In Reihe H kam anschließend 10 µl des zu untersuchenden Serums und ergab damit eine Ausgangsverdünnung von 1:16. Weiter verdünnt wurde mit dem Microdiluter (50 µl fassend, Fa. Dynatec) bis 1:512.

Mit der höchsten Verdünnungsstufe beginnend, wurden 0,01 ml Serumverdünnung auf die entsprechenden Antigenfelder überpipettiert. Danach wurde 45 min in der feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser abgespült und 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen und danach vorsichtig zwischen Löschpapier getrocknet.

Nach dem Trocknen wurde 1:20 verdünntes FITC-Konjugat aufgetragen. Die Gebrauchsverdünnung war zuvor ausgetestet worden. Getestet wurden die Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:50, 1:100. Als Kontrollserum diente das positive Kaninchenserum.

Ergebnis: Die Verdünnung 1:50 ergab gegenüber der Verdünnung 1:20 einen Titerabfall um eine Stufe, bei der Verdünnung 1:100 waren es sogar zwei Stufen. Die Verdünnung 1:10 erbrachte dagegen gegenüber der Verdünnung 1:20 keinen Titeranstieg, so daß mit einer Verdünnung von 1:20 gearbeitet werden konnte.

Je nach Herkunft der Seren wurden folgende Konjugate verwendet :

Konjugat	Herkunft	Firma
Anti rabbit IgG (H+L)	Schaf	Institut Pasteur
Anti mouse IgG (H+L)	Schaf	Institut Pasteur
Anti mouse IgM (Fc-Fragment)	Ziege	Fa Cappel
Anti dog IgG (H+L)	Ziege	Fa. Cappel
Anti dog IgM (Fc-Fragment)	Ziege	Fa. Cappel
Anti bovine IgG (H+L)	Ziege	Fa. Cappel
Anti bovine IgM (Fc-Fragment)	Schwein	Fa. Paesel

Der Konjugatverdünnung wurde pro 1 ml 0,1 ml Evans Blue zugegeben (1% Lösung in Aqua dest.).

Auf jedes Antigenfeld wurden je 10 µl des entsprechenden Konjugates aufgebracht.

Danach wurde erneut im Brutschrank für 45 min inkubiert, die Objektträger hinterher wieder vorsichtig mit Leitungswasser abgespült und 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurde noch 2 mal 5 min in Aqua dest. gewaschen.

Nach dem Abtrocknen zwischen Löschpapierblättern wurden die Objektträger mit je einem Tropfen gepufferten Glycerin (pH 7,6) eingedeckelt.

Die Ablesung und Beurteilung der Präparate erfolgte in einem Fluoreszenzmikroskop (Orthoplan, Fa. Leitz, Auflichtvergrößerung, Okular 6,3, Objektiv 40).

Als eindeutig positiv wurde ein Befund bei Hunde- und Rinderseren dann gewertet, wenn bei einer Serumverdünnung von $\geq 1:64$ mindestens 50% der Borrelien deutlich fluoreszierten, bei den Mäuseseren $\geq 1:32$.

3.1.7 Untersuchungen auf das Vorkommen von Kreuzreaktionen zwischen Borrelien und Leptospiren

Die mit Hilfe des IFAT auf IgG- und IgM-Antikörper gegen Borrelien untersuchten Mäuse-, Hunde- und Rinderseren wurden im Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim auf Antikörper gegen Leptospiren getestet, um etwaige Kreuzreaktionen aufzuzeigen oder auszuschließen.

3.1.7.1 Antigengewinnung für die Mikroagglutinations- reaktion

Es wurden 22 Serovare in in flüssigem EMJH-Rinderserum-albumin-Tween 80-Medium kultiviert, die in jeweils 14tägigen Abständen auf neue Nährmedien überimpft und bei 30°C ca. 7 Tage bebrütet wurden. Das Wachstum und die Dichte der Kulturen wurde im Dunkelfeld laufend geprüft. Tabelle 2 gibt Auskunft über die Einordnung der 22 Serovare, die zur Untersuchung herangezogen wurden.

Die ersten 18 Stämme gehören zur Art *Leptospira interrogans*, die für Mensch und Tier als pathogen angesehen wird, die restlichen 4 dagegen sind bei der apathogenen Art *Leptospira biflexa* einzuordnen.

3.1.7.2 Durchführung und Auswertung der WAR

Die Seren wurden bis zur Untersuchung in Eppendorff-Reaktionsgefäßen in Portionen zu je 50 µl bei -20°C aufbewahrt.

Stamm	Serogruppe	Serovar
Leptospira interrogans	1 Pyrogenes	pyrogenes
	2	zanoni
	3 Australis	australis
	4	bratislava
	5 Autumnalis	autumnalis
	6 Ballum	ballum
	7 Bataviae	bataviae
	8 Hebdomadis	hebdomadis
	9 Canicola	canicola
	10 Celledoni	celledoni
	11 Icterchaemorrhagiae	kopenhageni
	12 Tarassevi	tarassevi
	13 Sejroe	sejroe
	14	saxkoebing
	15	hardjo
	16 Grippotyphosa	grippotyphosa
	17 Javanica	poi
	18 Pomona	pomona
L. biflexa	19 Stamm 19 = Patoc	
	20 Stamm 20 = Monte Valiero	
	21 Stamm 21 = Sao Paulo	
	22 Stamm 22 = Andaman	

Tabelle 2 : Übersicht über die 22 Leptospirenstämme

Für die Herstellung der Serumverdünnungen wurde zunächst eine Ausgangsverdünnung von 1,44 ml isotonischer NaCl-Lösung zu 60 µl Serum angesetzt. Von diesen Verdünnungen wurde in Reaktionsgefäße, gemäß der Anzahl der Antigene, jeweils 50 µl einpipettiert.

Zu diesen 22 Serumverdünnungen (1:25) wurden dann je 50 µl des entsprechenden Leptospirenantigens gegeben, so daß die Serum-Endverdünnung 1:50 betrug. Nach kurzem Schütteln kam der Reaktionsansatz für mindestens 2 Stunden in den Brutschrank (ca. 30°C). Danach erfolgte die Prüfung des Reaktionsgemisches im Dunkelfeld.

Waren mehr als 50% der Leptospiren agglutiniert, so wurden die Seren am nächsten Tag im Hauptversuch in höheren Verdünnungsstufen angesetzt.

Die Verdünnungen erfolgten mit dem Faktor 2, d.h. Serumverdünnungen 1:100, 1:200, 1:400 usw. wurden hergestellt.

Die Beurteilung der Agglutination erfolgte im Dunkelfeldmikroskop (Fa. Zeiss, 250fache Vergrößerung). Dazu wurde je ein Tropfen jedes Ansatzes auf einen Objektträger gebracht.

Positive Reaktion : mehr als 50% der Leptospiren
sind agglutiniert

Negative Reaktion : die Leptospiren sind nach Anzahl, Bewegung und Form unverändert

Als Endtiter wurde die Titerstufe gewählt, bei der noch eine 50%ige Agglutination eintrat.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Der Nachweis von Borrelien in Zeckendarmpräparationen mit Hilfe des direkten Immunfluoreszenztestes

Die vom erlegten Rehwild abgelesenen *I. ricinus* wurden in 4 Klassen unterteilt :

1. Nymphen
2. männliche adulte Zecken
3. weibliche, ganz oder zum Teil vollgesogene adulte Zecken
4. weibliche, nüchterne adulte Zecken

Andere Zeckenarten als *I. ricinus* wurden bei dem untersuchten Rehwild nicht gefunden.

17 von insgesamt 26 untersuchten Tieren (65%) waren von *I. ricinus* befallen.

Von den 434 abgelesenen Zecken waren 23 Nymphen (5,3%), 167 weiblich adult (38,5%) und 244 (56,2%) männlich adult.

Tabelle 3 gibt Auskunft über Anzahl der untersuchten Rehe pro Monat, Anzahl der Zecken pro Tier sowie Anzahl und Prozentsatz mit Borrelien infizierter Zecken.

Bei 13 Rehen (50% der untersuchten Tiere), von denen nur 4 oder weniger Zecken abgesammelt werden konnten, war die Anzahl der infizierten Zecken gleich Null.

Von den 434 untersuchten Zecken waren 47 (11%) mit Borrelien infiziert, und zwar in einer Schwankungsbreite von 4% im Minimum und 21% im Maximum. Die höchste Infektionsquote von 21% der untersuchten

Monat	Anzahl untersuchter Tiere (n=26)	Anzahl Zecken pro Tier				mittlerer Zecken- befall pro Tier	Infizierte Zecken	
		1	2	3	4		pro Tier	%
Mai	3	10/	0/	16		9	1/0/2	10/ 0/13
Juni	3	24/23/32				26	5/1/6	21/ 4/19
Juli	4	48/82/63/52				61	3/8/6/3	6/10/10/ 6
August	4	26/25/16/ 0				31	4/5/3/0	15/20/19/ 0
September	3	4/ 0/ 0				1	0/0/0	0/ 0/ 0
Oktober	3	3/ 4/ 0				2	0/0/0	0/ 0/ 0
November	4	3/ 3/ 0/ 0				2	0/0/0/0	0/ 0/ 0
Dezember	2	0/ 0				0	0/0	0/ 0/ 0
Total	26	434					47	

Tabelle 3 : Befall von 26 Rehen mit *I. ricinus* in den Monaten Mai bis Dezember 1985 sowie infizierte Zecken pro Tier und Monat

Zecken/Tier entfiel auf den Monat Juni. Abbildung 4 zeigt die im Mitteldarm von *I. ricinus* parasitierenden Borrelien in der Fluoreszenz erkennen.

Bei den infizierten *I. ricinus* handelt es sich um 1 Nymphe, 18 weibliche adulte und 28 männliche adulte *Ixodes ricinus*.

Ernährungszustand der infizierten Zecken :

Die Nymphe war teilweise vollgesogen, 3 der 18 infizierten weiblichen Adulten ebenfalls (17% der Weibchen), die restlichen 15 weiblichen adulten *I. ricinus* erschienen nüchtern.

Erwähnt sei noch, daß es nicht gelang, Borrelien aus Zeckendarmpräparaten in die Kultur zu bringen.



Abbildung 4 : Borrelien aus dem Mitteldarm von
Ixodes ricinus, direkte Immunfluoreszenz-
färbung, 400 - fache Vergrößerung

3.2.2 Serologische Untersuchungen

3.2.2.1 Der Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Borrelien mit Hilfe des IFAT

3.2.2.1.1 Antikörper in Mäuseseren

Als positive Antikörperkontrolle diente das Serum eines entmilzten Gerbils, der am 6.9.1985 mit 0,8 ml Stabilat *Borrelia spec.* Schwanheim geimpft worden war und 4 Tage p.i. Spirochätämie im Peripherblut aufwies. 2 Wochen später wurde das Tier entblutet, Serum durch Zentrifugieren des Vollblutes gewonnen. Die serologische Untersuchung mit Hilfe des IFAT ergab einen Antikörpertiter von 1:2048 (IgG).

Das negative Kontrollserum stammte von einem Gerbil aus der Zucht des Institutes. Der nach Giemsa gefärbte Blutaussstrich hatte keinen Nachweis von Borrelien erbracht und auch im IFAT konnten keine Antikörper gegen Borrelien entdeckt werden. Insgesamt wurden 4 Tiere untersucht. Ein Tier aus dieser Gruppe wies einen Titer von 1:16 (IgG) auf, so daß diese Reaktion als unspezifisch positiv angesehen werden konnte. Der Grenztiter für Borreliose bei Mäusen wurde für 1:32 festgelegt.

Gruppe 1

Das Ergebnis der Untersuchung von 43 Mäusen (33 Röt- und 10 Gelbhalsmäuse) ist in Abbildung 5 dargestellt. 36 (83,72%) Probanden blieben in den Titerstufen 1:32 ohne Befund. Erhöhte ($\geq$ 1:32) IgG-Titer fanden sich

bei allen 7 seropositiven Tieren. IgM-Antikörper konnten bei einer Serumverdünnung von $\geq 1:16$ nicht festgestellt werden.

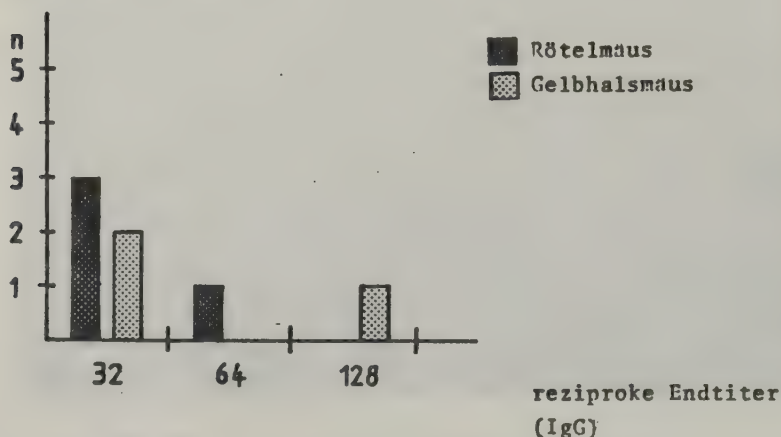


Abbildung 5 : Befunde der serologischen Untersuchung von 43 Mäusen im IFAT, Titerbereich 1:32 bis 1:128. Auf der Ordinate sind die Absolutzahlen, auf der Abszisse die reziproken Titerwerte angegeben.

Die Mäuseseren wurden gegen alle 12 Borrelienantigene getestet. Die höchsten Titerstufen (1:128) wurden gegen *Borrelia spec.* Grafrath 75, Schwanheim 128 und Österreich erreicht. Gegen *B. tillae*, *B. duttoni* und *B. recurrentis* ergab sich ein Titerabfall um eine Stufe, gegen die *B. crocidurae*-Antigene sogar um zwei Stufen.

Gruppe 2

Das Ergebnis der Untersuchung von 23 Kleinsäugetern (11 Rötelmäuse, 7 Waldmäuse, 3 Feldmäuse und 2 Gelbhalsmäuse) zeigt Abbildung 6.

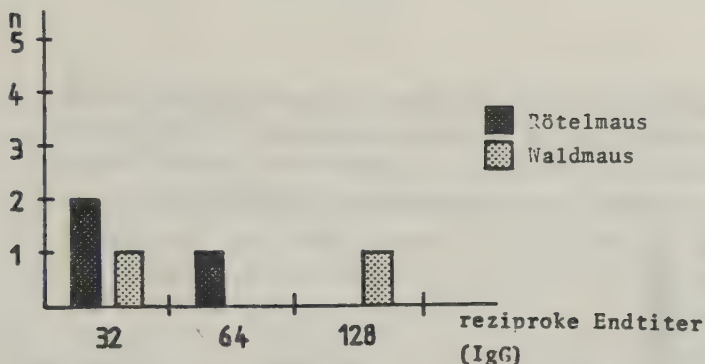


Abbildung 6 : Serologische Ergebnisse der Grafrather Mäuse

18 Probanden (78,26%) blieben in der unter-schwelligen Titerstufe 1:16 ohne Befund. Positive Titerwerte ($\geq$ 1:32) wurden bei 5 Tieren erreicht.

Auch diese 23 Mäuseseren wurden gegen die 12 zur Verfügung stehenden Borrelien-Antigene untersucht.

Die höchste Titerstufe (1:128) wurde wieder gegen *Borrelia spec. Grafrath* und *Borrelia spec. Schwanheim* und *Borrelia spec. Österreich* erzielt. Bei *B. duttoni*, *B. tillae*, *B. recurrentis* und *B. crocidurae* kam es zu einem Titerabfall um zwei Stufen.

3.2.2.1.2 Antikörper in Hundeseren

Es wurden 11 Hundeseren aus Neustadt/Aisch sowie 61 Hundeseren aus Einsendungen an das Tropeninstitut mit Hilfe des IFAT gegen die 12 Antigene auf Antikörper gegen Borrelien untersucht.

Das Ergebnis dieser Stichprobenuntersuchung wird in Abbildung 7 veranschaulicht.

Die anamnestiche Befragung erbrachte Hinweise auf Erkrankungen, die möglicherweise mit einer Infektion durch die einheimische Standortvariante von *Borrelia burgdorferi* in Zusammenhang zu bringen sind.

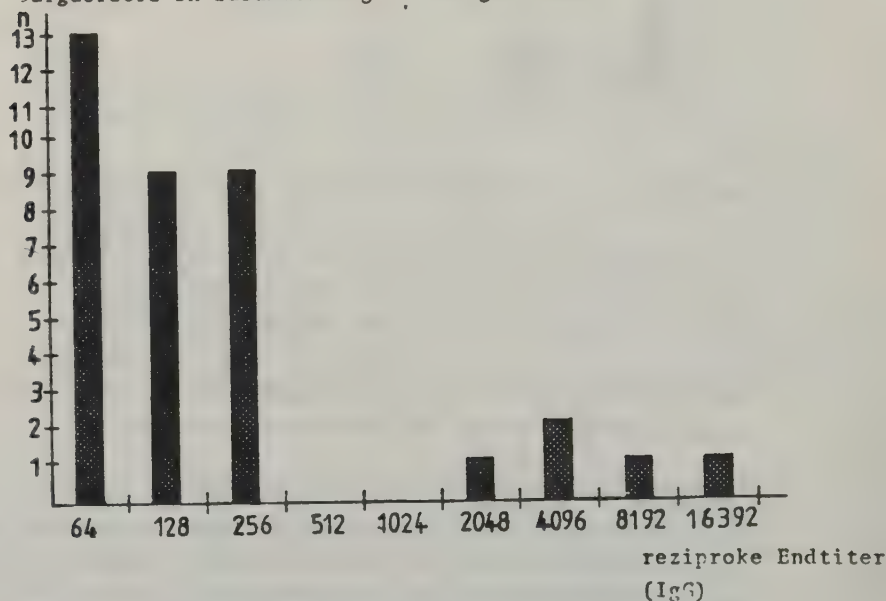


Abb. 7 : Positive Befunde (n=44) der Untersuchung von 72 Hunden auf IgG-Antikörper gegen Borrelien

Auf der Ordinate sind die Absolutzahlen, auf der Abszisse die reziproken Endtiter angegeben.

In Tabelle 3 sind Geschlecht, Alter sowie Rasse der 44 seropositiven Tiere aufgeführt.

Bei diesen Tieren wurde anschließend eine Untersuchung auf IgG-Antikörper durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Insgesamt 10 Hunde hatten bei Verdünnungen $\geq 1:64$ außer IgG- auch IgM-Antikörper im Serum.

<u>Geschlecht</u>	weiblich	23
	männlich	21
<u>Alter</u>	≤ 1	0
	2-4	14
	5-7	13
	8-10	11
	≥ 11	4
<u>Rasse</u>	Mischlinge	19
	Dt. Schäferhund	6
	Schnauzer	3
	Mastino N.	1
	Bernhardiner	1
	Pudel	3
	Irischer Setter	2
	Airdale Terrier	1
	Beagle	3
	Bearded Collie	1
	gr. Münsterländer	1
	Dt. Kurzhaar	1
	Dt. Dogge	1
	Skye Terrier	1
Total		44

Tab.3 : Demographische Daten der 44 Borrelien-seropositiven Hunde

Sämtliche 72 Seren wurden sowohl im IgG- als auch im IgM-Test gegen alle 12 Borrelienantigene untersucht. Die höchsten Titerwerte wurden hier ebenfalls gegen die einheimischen Borreliensämme (Grafrath 75, Schwanheim 128 und Österreich 190) erreicht. Die übrigen Antigene erbrachten gegenüber den drei vorhergenannten einen Titerabfall um mindestens eine Stufe.

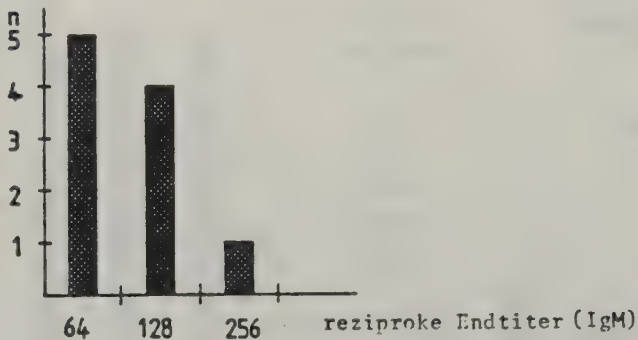


Abb. 3 Befunde der Untersuchung der 44 IgG-positiven Hundeseren gegen Borrelien auf IgM-Antikörper

Die Ordinate gibt die Absolutzahlen an, die Abszisse die reziproken Endtiter

Die anamnestiche Befragung der Besitzer der Hunde, die aus Neustadt/Visch stammten, erbrachte das Ergebnis, daß alle 11 Hunde im Frühjahr oder Sommer 1985 von Zecken gestochen worden waren. Über eventuelle Zeckenexposition der 61 anderen Tiere konnte nichts in Erfahrung gebracht werden.

Die klinischen Befunde, die bei den 44 seropositiven Hunden erhoben worden waren, sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

<u>klinischer Befund</u>	<u>Anzahl Tiere (n=44)</u>	<u>%</u>
chronische Hautveränderungen	11	25%
Arthritis unklarer Genese	6	13,64%
gestörtes Allgemeinbefinden	23	52,27%
mit Fieber und Lymphknotenschwellungen		
ekzematoöse Dermatitis	4	9,09%
Total-	44	100%

Tabelle 4 : klinische Befunde der Borrelien-seropositiven Hunde

4 der insgesamt 6 Tiere, die an Arthritis erkrankt sind, wiesen neben IgG- auch IgM-Antikörper auf (3mal 1:64, einmal 1:128). Die restlichen 6 IgM-positiven Seren entfielen auf Hunde, bei denen Fieber und Lymphknotenschwellungen im Vordergrund standen.

3.2.2.1.3 Antikörper in Rinderseren

Der Grenzwert für positive Reaktionen gegen Borrelien beim Rind wurde mit 1:64 festgelegt, analog zu den Hunden. Erfahrungswerte für das Rind existieren bis jetzt noch keine.

Das Ergebnis des Serosurveys ist in Abbildung 9 zusammengefaßt.

Bei den Untersuchungen von Rinderseren fehlten die Berichte über den allgemeinen Zustand und das klinische Bild der Reagenten.

Von den insgesamt 66 untersuchten Tindern wurden bei 22 IgG-Antikörper gegen Borrelien (33,33%) in den Höhen 1:64 bis 1:512 ermittelt.

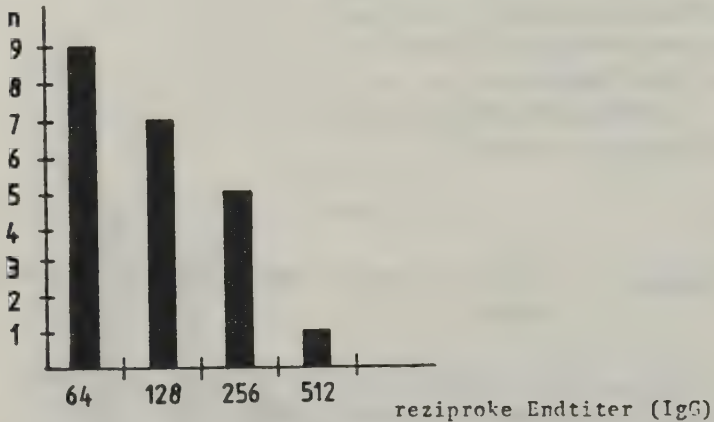


Abb. 9 : Positive Befunde der Stichprobenuntersuchung auf Antikörper gegen Borrelien (n=22)

Bei den positiv reagierenden Tieren wurden die Seren auch auf IgM-Antikörper getestet. Ergebnis: bei drei Tindern wurden gleichzeitig IgG- und IgM-Antikörper gefunden, wobei der Titerwert bei allen dreien 1:64 betrug.

In Tabelle 5 sind die 22 seropositiven Probanden nach Rasse, Herkunft und Haltungsart aufgelistet.

Anhand dieser Aufstellung wird deutlich, daß Probanden mit Antikörpern gegen Borrelien ausschließlich Tiere mit Weidegang waren und somit auch Zecken als Imaginalwirte gedient haben könnten.

Bestand	Rasse	geograph.Herkunft	Haltungsart	Anzahl Tiere positiv/ Tiere untersucht	%
1	SB	Weilheim-Schongau	Weidegang	7/12	58,33
6	Brv.	Neu-Ulm	"	2/4	50
7	Brv.	Unterallgäu	"	1/2	50
9	SB	Dillingen	"	3/7	42,86
11	Flv.	Rosenheim	"	1/2	50
17	Flv.	Bad Tölz-Wolfratshausen	"	3/9	33,33
18	Brv.	Oberallgäu	"	3/6	50
19	Flv.	Günzburg	"	1/3	33,33
20	SB	Unterallgäu	"	1/1	100

Tab. 5 : Auflistung der 22 seropositiven Rinder nach Bestand, Rasse, Haltungsart sowie geographischer Herkunft
(SB = Schwarzbunt, Brv = Braunvieh, Flv = Fleckvieh)

Alle im IFAT positiv reagierenden Seren (n=22) wurden gegen die 12 zur Verfügung stehenden Borrelien-Antigene getestet. Auch hier wurde die höchste Titerstufe (1:512) gegen die 3 einheimischen Antigene erzielt. Bei Antigenverwendung von *B. duttoni*, *B. tillae* und *B. recurrentis* kam es zum Titerabfall um eine Stufe, gegen die *B. crocidurae*-Stämme waren die Titerwerte sogar teilweise um zwei Stufen niedriger als bei den 3 einheimischen Stämmen.

3.2.2.2 Kreuzreaktionen zwischen Borrelien und Leptospiren

3.2.2.2.1 Kaninchenserum

Sowohl das positive als auch das negative Borrelien-Referenzserum vom Kaninchen blieb bei der Mikroagglutinationsreaktion negativ.

3.2.2.2.2 Mäuseseren

Auch hier reagierten positives und negatives Borrelien-kontrollserum bei einer Serumverdünnung $\geq 1:50$ gegen alle 22 Leptospirenstämme negativ.

Die untersuchten Mäuseseren aus Grafrath und Schwanheim blieben ebenfalls negativ.

3.2.2.2.3 Hundeseren

Es wurden 11 Hundeseren aus dem Landkreis Neustadt-Aisch/Bad Windsheim sowie 61 Hundeseren aus Einsendungen an das Tropeninstitut 1985 auf Antikörper gegen die 22 Leptospirenserovare mittels WAR untersucht. Sämtliche 72 Seren waren zuvor mit Hilfe des IFAT auf Antikörper gegen die 12 Borrelienstämme getestet worden.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse aus der WAR von 48 Hundeseren, die bei einer Serumverdünnung $\geq 1:50$ in der WAR positiv waren, nach ihren Titerwerten gegen die 22 Leptospirenserovare aufgeführt.

Doppel- oder Mehrfachreaktionen eines Serums mit verschiedenen Serovaren wurden in der Statistik mitaufgeführt.

Serovar	Verdünnungsstufen MAR							Total	%	%
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200			
									Reak- tionen (n=120)	Gesamt- zahl (n=72)
L.pyrogenes	1	-	2	-	-	-	-	3	2,50	4,17
L.zanoni	2	-	-	-	1	-	-	3	2,50	4,17
L.australis	1	-	-	3	1	-	-	5	4,17	6,94
L.bratislava	2	2	2	-	8	1	-	15	12,50	20,83
L.autumnalis	1	-	-	-	-	-	-	1	0,83	1,39
L.ballum	-	-	1	-	-	-	-	1	0,83	1,39
L.bataviae	1	-	-	-	-	-	-	1	0,83	1,39
L.hebdomadis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.canicola	7	2	4	1	-	-	-	14	11,67	19,44
L.celledoni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.kopenhageni	8	4	3	-	1	-	-	16	13,33	22,22
L.tarassovi	1	-	-	-	-	-	-	1	0,83	1,39
L.saxkoebing	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.hardjo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.sejroe	1	-	-	-	-	-	-	1	0,83	1,39
L.grippotyphosa	9	4	1	1	-	-	-	15	12,50	20,83
L.poi	1	1	1	-	-	-	-	3	2,50	4,17
L.pomona	3	-	-	1	-	-	-	4	3,33	5,56
L.patoc	1	-	-	-	-	-	-	1	0,83	1,39
L.monte val.	3	1	-	-	-	-	-	4	3,33	5,56
L.sao paulo	9	7	6	-	-	-	-	22	18,33	30,56
L.andaman	1	2	4	2	1	-	-	10	8,33	9,72
Total	52	23	24	6	12	1	-	120	100%	-

Tabelle 6 : Zusammenstellung der Serovarverteilung der 48 Leptospirose-Antikörper-positiven Hundeseren, bezogen auf Anzahl der Reaktionen (n=120) sowie Gesamtzahl der untersuchten Tiere (n=72)

28 (40,27%) Hunde reagierten sowohl in der MAR als auch im IFAT.

Tabelle 7 zeigt die Verteilung dieser 28 Seren auf die verschiedenen Leptospirenserovare, Mehrfachreaktionen eines Serums sind berücksichtigt.

Serovar	Verdünnungsstufen MAR					Total	% Reak- tionen (n=68)
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800		
pyrogenes	1	-	-	-	-	1	1,47
zaroni	1	-	-	-	-	1	1,47
australis	-	-	-	2	-	2	2,94
bratislava	1	1	1	-	2	5	7,35
ballum	-	-	1	-	-	1	1,47
canicola	7	-	4	-	-	11	16,18
kopenhageni	6	3	1	-	-	10	14,71
tarassovi	1	-	-	-	-	1	1,47
sejroe	1	-	-	-	-	1	1,47
grippotyphosa	5	2	1	-	-	8	11,76
poi	1	-	-	-	-	1	1,47
pomona	1	-	-	1	-	2	2,94
monte valiero	2	1	-	-	-	3	4,41
sao paulo	7	4	3	-	-	14	20,59
andaman	1	1	2	2	1	7	7,35
Total	35	12	13	5	3	68	100%

Tabelle 7 : Verteilung der 28 Hundeseren auf verschiedene Leptospirenserovare, die gleichzeitig Antikörper gegen Borrelien aufwiesen

In Tabelle 8 werden die Titerhöhen dieser 28 Seren gegen Borrelien und Leptospiren einander gegenüber gestellt. Mehrfachreaktionen eines Serums gegen verschiedene Leptospirenserovare sind berücksichtigt.

Titerwert gegen Leptospirenserovare
($\geq 1:50$)

Titerwert gegen Borrelien
1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048 1:4096

Serovar pyrogenes	1:50	1		1					
zanoni	1:50	1		1					
australis	1:400	2				1		1	
bratislava	1:50	1				1			
	1:100	1			1				
	1:200	1		1					
	1:800	2				1		1	
ballum	1:200	1	1						
canicola	1:50	7	1	2	2	2			
	1:200	4	2	1	1				
kopenhageni	1:50	6	1	2	3				
	1:100	3	2			1			
	1:200	1	1						
tarassovi	1:50	1			1				
sejroe	1:50	1	1						
grippotyphosa	1:50	5			3				2
	1:100	2			1	1			
	1:200	1	1						
poi	1:50	1		1					
pomona	1:50	1						1	
	1:400	1	1						
monte valiero	1:50	2			1	1			
	1:100	1			1				
sao paulo	1:50	7	1	1	1	4			
	1:100	4		1	2			1	
	1:200	3	1	1		1			
andaman	1:50	1			1				
	1:100	1			1				
	1:200	2		1		1			
	1:400	2		1				1	
	1:800	1			1				

Anzahl Reaktionen im MAR: 68

Tabelle 8: Vergleich der Titerwerte der 28 Seren, die im MAR ($\geq 1:50$) gegen Leptospiren und im IFAT ($\geq 1:64$) gegen Borrelien positiv waren. Die Mehrfachreaktionen eines Serums gegen verschiedene Leptospirenserovare sind berücksichtigt.

68 = Gesamtzahl der Reaktionen im MAR

19 Hunde (26,39%) reagierten gegen verschiedene Leptospirenserovare in der MAR, Antikörper gegen Borrelien konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Tabelle 9 zeigt die Verteilung dieser Seren auf die verschiedenen Leptospirenserovare, wobei Mehrfachreaktionen einzelner Seren wiederum berücksichtigt wurden.

Sero-var	Verdünnungsstufe						Total	%
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600		
L.pyrogenes	-	-	2	-	-	-	2	3,85
L.zanoni	1	-	-	-	1	-	2	3,85
L.australis	1	-	-	1	1	-	3	5,77
L.bratislava	1	1	1	-	6	1	10	19,23
L.autumnalis	1	-	-	-	-	-	1	1,92
L.bataviae	1	-	-	-	-	-	1	1,92
L.conicola	-	2	-	1	-	-	3	5,77
L.kopenhageneri	2	1	2	1	-	-	6	11,54
L.grippotyphosa	4	2	-	1	-	-	7	13,46
L.poi	-	1	1	-	-	-	2	3,85
L.pomona	2	-	-	-	-	-	2	3,85
L.patoc	1	-	-	-	-	-	1	1,92
L.montivaliero	1	-	-	-	-	-	1	1,92
L.sao paulo	2	3	3	-	-	-	8	15,40
L.andaman	-	1	2	-	-	-	3	5,77
Total	17	11	11	4	8	1	52	100%

Tabelle 9 : Verteilung der 19 Borrelien-negativen Seren auf die verschiedenen Leptospirenserovare. Mehrfachreaktionen sind berücksichtigt. Gesamtzahl der Reaktionen : 52

9 Hunde blieben sowohl im IFAT als auch in der 'AR negativ.

Von den insgesamt 44 Tieren, die bei einer Serumverdünnung $\geq 1:64$ Antikörper gegen Borrelien aufwiesen, reagierten 28 auch in der 'AR gegen Leptospiren (Serumverdünnung $\geq 1:50$) positiv (65,90%).

Von den 28 Seren, die im IFAT auf Borrelien negativ blieben, reagierten 19 in der 'AR (67,85%).

Die Untersuchungen ergaben somit, daß die 28 Borrelien-negativen Tiere häufiger Antikörper gegen Leptospiren hatten als die 44 Tiere, die in der Untersuchung auf Borrelien-Antikörper positive Ergebnisse lieferten.

In Tabelle 10 wird die Leptospirenserologie der 72 untersuchten Hunde zusammenfassend dargestellt. Aus dieser Aufstellung wird ersichtlich, daß die Tiere ohne Antikörper gegen Borrelien im Serum meist höhere durchschnittliche Titer gegen Leptospirenserovare aufweisen als solche mit Antikörpern gegen Spirochaeten.

Antikörper Antikörper gegen gegen Borrelien Leptospien		Leptospienserovara																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
positiv (n=48)	Anzahl	1	1	2	5	-	1	-	-	11	-	10	1	-	-	1	8	1	1	-	3	14	7
	% positiv	2,27	2,27	4,54	11,36		2,27			25		22,73	2,27			2,27	18,18	2,27	2,27		6,82	31,82	15,91
	durchschnittl. Titer	50	50	400	750	100			105		70	50			50	81,3	50	50		66	96	307	
negativ (n=28)	Anzahl	2	2	3	10	1	-	1	-	3	-	5	-	-	-	-	7	2	2	1	1	8	3
	% positiv	7,14	7,14	10,71	35,71	3,57		3,57		10,71		17,86					25	7,14	14,26	3,57	3,57	28,57	10,71
	durchschnittl. Titer	200	50	417	675	50	50	200	200	380					114	75	50	50	50	50	125	233	

Tabelle 10 : Antikörper der 72 Hundeseren gegen 22 Leptospierserotypen
(Anzahl der Tiere, % positiv und Durchschnittstiter)
bezogen auf ihren Antikörperstatus gegenüber Borrelien.

3.2.2.2.4 Rinderseren

Es wurden 66 Rinderseren aus 20 Beständen auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen 22 Leptospirenserovare mittels Mikroagglutinationsreaktion getestet. Die Seren waren zuvor mit Hilfe des IFAT auf Borrelien untersucht worden.

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse aus der MAR von 56 Rindern aufgeführt, die bei einer Verdünnung $\geq 1:50$ gegen verschiedene Serovare reagierten. Doppel- und Mehrfachreaktionen eines Serums mit verschiedenen Serovaren werden in dieser Statistik berücksichtigt.

Serovar	Verdünnungsstufen							Total	%	%
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200			
									Reak- tionen (n=21,4)	Gesamt- zahl (n=66)
pyrogenes	-	1	-	-	-	-	-	1	0,47	1,55
zanoni	1	2	-	-	-	-	-	3	1,40	4,54
australis	-	1	-	-	-	-	-	1	0,47	1,51
bratislava	2	-	-	4	-	-	-	6	2,80	9,09
autumnalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ballum	1	-	-	-	-	-	-	1	0,47	1,51
bataviae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hebdomadis	1	6	8	4	3	-	-	22	10,3	33,33
canicola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
celledoni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kopenhageneri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tarassovi	2	5	1	-	-	-	-	8	3,74	12,12
hardjo	-	3	3	9	9	6	2	26	12,15	39,39
saxkoebing	-	5	7	5	7	2	-	26	12,15	39,39
Sejroe	1	8	5	10	-	-	-	24	11,21	36,36
grippotyphosa	4	3	1	1	2	1	-	12	5,61	-
poi	-	1	-	-	-	-	-	1	0,47	1,51
pomona	1	1	-	-	-	-	-	2	0,93	-
patoc	11	6	-	-	-	-	-	17	7,94	25,75
monte valiero	10	1	-	-	-	-	-	11	5,14	16,66
sao paulo	17	20	1	-	-	-	-	38	17,76	57,57
andaman	4	1	3	1	3	1	2	15	7,01	22,72
Total	55	64	29	28	2	10	4	214	100%	

Tabelle 11 : Zusammenstellung der Serovarverteilung der 56 in der MAR ($\geq 1:50$) reagierenden Rinderseren, bezogen auf Anzahl der Reaktionen (n=213) sowie Gesamtzahl der untersuchten Tiere (n=66)

18 (27,27%) Rinder hatten sowohl in der MAR gegen verschiedene Leptospirenserovare einen positiven Titerwert als auch im IFAT Antikörper gegen Borrelien.

Die Verteilung dieser Tiere nach ihren Leptospirose-Titern veranschaulicht Tabelle 12.

Sero-var	Verdünnungsstufe (MAR)							Total	% Reaktion
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200		
pyrogenes	-	1	-	-	-	-	-	1	1,22
zanoni	1	-	-	-	-	-	-	1	1,22
bratislava	1	-	-	3	-	-	-	4	4,88
hebdomadis	1	2	3	3	3	-	-	12	14,63
tarassovi	-	2	1	-	-	-	-	3	3,65
hardjo	-	-	1	2	3	4	1	11	13,41
saxkoebing	-	2	5	3	5	1	-	16	19,51
sejroe	-	4	1	4	-	-	-	9	10,98
grippotyphosa	1	1	-	1	-	-	-	3	3,65
patoc	1	3	-	-	-	-	-	4	4,88
monte valiero	2	-	-	-	-	-	-	2	2,44
sao paulo	2	10	-	-	-	-	-	12	14,63
andaman	2	1	-	-	-	1	-	4	4,88
Total	11	26	11	16	11	6	1	82	100%

Tabelle 12 : Verteilung der 18 Rinderseren auf versch. Leptospirenserovare, die gleichzeitig Antikörper gegen Borrelien aufwiesen, Mehrfachreaktionen sind berücksichtigt;
Gesamtzahl der Reaktionen : (n= 82)

38 (57,58%) der untersuchten Rinder reagierten im MAR ($\geq 1:50$), bei einer Verdünnung von $> 1:64$ im IFAT konnten jedoch keine Borrelien-Antikörper festgestellt werden. Die serologischen Ergebnisse (MAR) dieser Untersuchung sind in Tabelle 13 festgehalten. Mehrfachreaktionen eines Serums sind wieder berücksichtigt:

Serovar	Verdünnungsstufe MAR							Total	% Reaktionen (n=132)
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200		
zanoni	-	2	-	-	-	-	-	2	1,51
australis	-	1	-	-	-	-	-	1	0,75
bratislava	1	-	-	1	-	-	-	2	1,51
ballum	1	-	-	-	-	-	-	1	0,75
hebdomadis	-	4	5	1	-	-	-	10	7,57
tarrasovi	2	3	-	-	-	-	-	5	3,78
hardjo	-	3	2	1	6	2	1	15	11,36
saxkoebing	-	3	2	2	2	1	-	10	7,57
sejroe	1	4	4	6	-	-	-	15	11,36
grippotyphosa	3	2	1	-	2	1	-	9	6,82
poi	-	1	-	-	-	-	-	1	0,75
pomona	1	1	-	-	-	-	-	1	1,51
patoc	10	3	-	-	-	-	-	13	9,85
monte valiero	8	1	-	-	-	-	-	9	6,82
sao paulo	15	10	1	-	-	-	-	26	19,7
andaman	2	-	3	1	3	-	2	11	8,33
Total	44	38	18	12	13	4	3	132	100%

Tabelle 13 : Verteilung der 38 Borreliose-negativen
Pinderseren auf die verschiedenen Serozare,
einschließlich Mehrfachreaktionen

6 Rinder blieben sowohl in der MAR als auch im IFAT
negativ.

Titerwert gegen Leptospirenserovare (≥1:50)			Titerwert gegen Borrelien 1:64 1:128 1:256 1:512			
Serovar pyrogenes	1:50	1	1			
zanoni	1:50	1	1			
bratislava	1:50	1		1		
	1:400	3	1	2		
hebdomadis	1:50	1	1			
	1:100	2		1	1	
	1:200	3	1	2		
	1:400	3			3	
	1:800	3	1		1	1
tarassovi	1:100	2			1	1
	1:200	1	1			
hardjo	1:200	1			1	
	1:400	2	1	1		
	1:800	3		1	2	
	1:1600	4	1	1	1	1
	1:3200	1	1			
saxkoebing	1:100	2	1	1		
	1:200	5	2	2	1	
	1:400	3	1	1	1	
	1:800	5	1	2	2	
	1:1600	1	1			
sejroe	1:100	4	1	2	1	
	1:200	1	1			
	1:400	4			3	1
grippotyphosa	1:50	1		1		
	1:100	1	1			
	1:400	1	1			
patoc	1:50	1			1	
	1:100	3	1		1	1
monte valiero	1:50	2	2			
sao paulo	1:50	2	1		1	
	1:100	10	4	3	3	
andaman	1:50	2		1	1	
	1:100	1		1		
	1:1000	1			1	

Anzahl Reaktionen im MAP: 82

Tabelle 14 : Vergleich der Höhe der Titerwerte der 18 Rinderseren, die sowohl gegen Leptospiren als auch gegen Borrelien reagierten, Mehrfachreaktionen sind berücksichtigt. 82 = Gesamtzahl d. Reaktionen

In Tabelle 14 sind die Titerwerte dieser 18 Rinderseren gegen Borrelien und Leptospiren einander gegenübergestellt. Mehrfachreaktionen eines Serums gegen verschiedene Leptospirenserovare sind berücksichtigt.

Von den insgesamt 22 Tieren, die bei einer Serumverdünnung $\geq 1:64$ Antikörper gegen Borrelien aufwiesen, reagierten 18 auch im MAR gegen Leptospiren ($\geq 1:50$) positiv (81,81%).

Von den 44 Seren, die im IFAT negativ blieben, reagierten 38 in der MAR (86,36%).

Auch diese Untersuchungen brachten das Ergebnis, daß die 44 borrelien-negativen Rinder häufiger Antikörper gegen Leptospiren aufwiesen, als die 22 Tiere, die in der Untersuchung auf Borrelien positiv waren.

In Tabelle 15 schließlich wird die Leptospirenserologie der 66 untersuchten Rinder zusammengefaßt. Aus dieser Aufstellung wird ersichtlich, daß die 22 Tiere mit Antikörpern gegen Borrelien höhere durchschnittliche Titerwerte gegen die Leptospirenstämme aufweisen als die 44 Borrelien-negativen Tiere.

Antikörper
gegen
Borrelia

Antikörper
gegen
Leptospiren

positiv
(n=22)

Anzahl

% positiv

durchschnittl.
Titer

negativ
(n=44)

Anzahl

% positiv

durchschnittl.
Titer

Tabelle 15 : Antikörper der 66 Rinderseren gegen 22 Leptospirensereovare
(Anzahl der Tiere, % positiv, Durchschnittstitel), bezogen
auf ihren Antikörperstatus gegenüber Borrelien

4. Besprechung der Ergebnisse

4.1. Nachweis von Borrelien in Zeckendarmpräparaten

Da das europäische Rehwild als ein Hauptwirt für adulte *Ixodes ricinus* eine ähnlich tragende Rolle spielt wie in den USA der Weißwedelhirsch für *Ixodes dammini*, sollte erstmals überprüft werden, inwieweit diese Tierart als ein fester und wichtiger Bestandteil des natürlichen Basiszyklus für die einheimische Standortvariante von *B. burgdorferi* angesehen werden kann.

Seren von erlegtem Wild standen nicht zur Verfügung, so daß sich die Untersuchung auf Zecken, die vom Wirtstier abgelesen wurden, beschränken mußte.

Da sich die *Ixodes*-Borreliose hauptsächlich im Mitteldarm befindet und nur äußerst selten in den Malpighischen Gefäßen, der Hämolymphe oder im Genitaltrakt gefunden werden konnte (BURGDORFER, 1982), wurden ausschließlich Präparate von Darmausstrichen angefertigt.

Auf 17 (65%) von 26 untersuchten Tieren wurden *Ixodes ricinus* gefunden, davon waren 11% mit Borrelien infiziert, mit einer Schwankungsbreite von 4% im Minimum und 21% im Maximum pro Tier.

In den USA erzielten MAGNARELLI (1984) und MAIN (1984) ähnliche Ergebnisse : Rund 60% der von ihnen untersuchten Weißwedelhirsche waren Zeckenträger (*Ixodes dammini*); MAGNARELLI konnte in 14% der vom Tier abgelesenen Zecken Borrelien nachweisen.

Die amerikanischen Wissenschaftler spezialisieren sich bei ihren epidemiologischen Erforschungen auf Gebiete, die aufgrund der gehäuften Krankheitsfälle beim Menschen als endemisch für die Lyme-Krankheit angesehen werden.

In Europa sind endemische Herde für das Auftreten der *Ixodes-ricinus-Borrelie* noch kaum bekannt.

Es mußte deshalb für diese Stichprobenuntersuchung ein Gebiet willkürlich herausgegriffen werden.

Es wurde der Landkreis Neustadt/Aisch gewählt, da von dort Unterstützung von Jagdrevierinhabern zugesagt worden war.

Es ist unumgänglich, in nächster Zeit detaillierte epidemiologische Studien auch in der Bundesrepublik durchzuführen. Nur so ist es möglich, die Basiszyklen für die *Ixodes-ricinus-Borrelie* gezielt aufzuklären, um eventuell die schwächsten Glieder der Kette herauszufinden.

Nur 3 der 18 infizierten adulten weiblichen *I. ricinus* waren teilweise vollgesogen, die übrigen 15 erschienen nüchtern. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Zecken die *Borrelien* teilweise von einem anderen Wirt "mitgebracht" haben. Aufgrund der Dreiwirtigkeit von *Ixodes ricinus* muß deshalb gefolgert werden, daß auch unter den kleinen Wildsäugetieren bedeutende Naturreservoirs für *Borrelien* zu finden sind.

Das einheimische Rehwild ist somit ein wichtiger Imaginalwirt für *I. ricinus*, die Bedeutung als Träger von *Borrelien* ist dagegen für diese Tierart als geringer einzuschätzen.

Der starke Zeckenbefall der untersuchten Rehe mit Nymphen und Adulten sowie der relativ hohe Prozentsatz an infizierten Zecken weist darauf hin, daß diese Wildwiederkäuerart eine nicht unwesentliche Rolle bei der Dauerbewahrung von Borrelien spielt.

Gesichert werden sollten die Ergebnisse durch weiterführende Arbeiten. Empfehlenswert ist die parallele Untersuchung von Zecken und Blut der betreffenden Wildsäugerspezies auf Borrelien.

Mit Hilfe des Nachweises von Antikörpern gegen Borrelien im Serum der Tiere könnte der Nachweis erbracht werden, daß das einheimische Rehwild analog zum Weißwedelhirsch in den USA einen wichtigen Borrelienträger und somit Weitergeber darstellt.

4.2 Der Nachweis von Antikörpern gegen Borrelien in Tierseren

4.2.1 Mäuseseren

Der Nachweis spezifischer Antikörper erfolgte mit einem indirekten Immunfluoreszenztest (IFAT). Als Antigene wurden die 12 zur Verfügung stehenden Stämme verwendet.

In Vorversuchen war der Schwellenwert für signifikante Titer auf 1:32 festgelegt worden. MAGNARELLI (1984) legte den Grenzwert für positive Reaktionen im IFAT ebenfalls auf diese Titerstufe fest. Er bezog diesen Wert allerdings auf die natürlich mit Borrelien infizierte weißfüßige Mirschmaus.

Mit Hilfe des experimentell gewonnenen positiven Kontrollserums vom Gerbil (1:2048 IgG) waren alle Antigene auf ihre antigenetische Verwandtschaft hin überprüft worden. Die höchsten Titerwerte wurden bei den drei einheimischen Stämmen erzielt, bei den Außereuropäischen dagegen kam es zu Titerabfällen. Es wird deshalb für die drei einheimischen Stämme eine antigenetische Identität vermutet. Auch gegen B. burgdorferi-Antiserum vom Kaninchen reagierten sie am höchsten. Erst ein Vergleich bei standardisierter Präparation der Antigene in einem Testdurchlauf gäbe schlüssige Auskunft.

Für den Stamm aus Österreich gilt seine morphologische und serologische Identität mit B. burgdorferi als gesichert. Er reagierte jedoch nicht mit monoklonalen, gegen die Oberflächenproteine von B. burgdorferi gerichteten Antikörpern (STANEK 1985).

Über die beiden von KRAMPITZ (1976 u. 1984) isolierten Stämme aus Grafrath bzw. aus Schwanheim ist in dieser Hinsicht noch nichts bekannt. Die hohe antigenetische Verwandtschaft zu den zwei anderen einheimischen Stämmen ist mit dieser Arbeit zwar bewiesen, in weiterführenden Studien sollte jedoch anhand der elektronenoptischen Gestalt, der Bestimmung und dem Vergleich von Oberflächenproteinen sowie der Reaktion mit monoklonalen Antikörpern die Identität der beiden Ixodes-Borrelienstämme gesichert werden. Die antigenetische Verwandtschaft zeigte sich auch bei der nun zu besprechenden Untersuchung auf Borrelien von gefangenen Kleinsäugetieren aus der Natur: auch hier wurden die höchsten Titer gegen die einheimischen Stämme erzielt.

Kleine Wildsäuger können durch ihre Lebensweise und Ökologie wichtige Borrelienträger in einem Naturherd sein. Diese Rolle ist für die weißfüßige Mirschmaus auch für die Übertragung von *B. burgdorferi* in den USA gesichert. Mit dieser Arbeit sollte begonnen werden, auch für Europa Kleinsäugetiere als Träger und damit Naturreservoir für Borrelien herauszustellen.

19% der untersuchten 66 Mäuse wiesen in den Titerstufen 1:32 bis 1:256 Antikörper gegen Borrelien auf. Die Mäuse stammten aus zwei Gebieten, aus denen KRAMPITZ (1976 u. 1984) schon einmal die als Antigen benutzten *Spirochaeten* isolieren konnte. Mit 19% infizierten Mäusen liegt das Ergebnis etwas über dem, das MAGNARELLI bei der Untersuchung von weißfüßigen Mirschmäusen auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* erzielt hatte.

Umfangreiche epidemiologische Studien in den USA haben ergeben, daß *Peromyscus leucopus* als Wirt für *B. burgdorferi* von überragender Wichtigkeit ist.

Mit dieser Stichprobenuntersuchung ist erstmals ein Anfang gemacht worden, die Rolle der europäischen Wildnager als mögliche Dauerreservoirs der *Ixodes ricinus*-Borreliose näher zu beleuchten.

Da von den wenigen Mäusen dieses Serosurveys 19% Antikörper gegen Borrelien aufwiesen, muß angenommen werden, daß in den untersuchten Gebieten ein hoher Prozentsatz der Kleinsäuger (v.a. Fötel-, Wald- und Gelbhalsmäuse) mit Borrelien infiziert ist.

Die Untersuchung des Borrelienträgers allein genügt jedoch nicht, um die epidemiologische Situation eines Gebiets darzustellen. Mit dem vorliegenden Serosurvey sollte ein Anreiz gegeben werden, die Rolle außermenschlicher Reservoire für Borrelien aufzuklären.

Kleinsäuger können wichtige Bestandteile eines Naturherdes darstellen. Zu einem solchen Naturherd gehören aber außer der Kleinsäugerfauna auch Vögel sowie der geographische und klimatische Zustand der Landschaft. Die Biotopdiagnose der in einem Biotop zusammengeschlossenen Borrelienträger bestimmen die epidemiologische Situation in einem Naturherd.

Drei Komponenten sind im Naturherd eines Biotops zusammengeschlossen : Infektionserreger, Überträger und Reserviertier. Nur durch deren ständige biologische Wechselbeziehungen wird der Infektionsherd erhalten.

Die genaue Untersuchung eines Naturherdes ist nur möglich, wenn Wissenschaftler der verschiedensten Disziplinen zusammenarbeiten. Es sind dazu mikrobiologische, epidemiologische, wasser- und bodenhygienische, medizinisch-klinische, veterinärmedizinische, zoologische und klimatologische Untersuchungen nötig.

Ein solcher Naturherd kann aber nur durch eine Expedition von Fachspezialisten genau analysiert werden. Bezüglich der Ixodes-Borrelien-Infektion liegen umfangreiche Arbeiten aus den USA vor, während in Europa die epidemiologische Situation bis jetzt nur unzureichend erfaßt ist.

4.2.2 Hundeseren

Es wurden insgesamt 72 Hunde auf Antikörper gegen die 12 zur Verfügung stehenden Borrelien-Antigene getestet.

Die höchste Antigenität wiesen analog der Untersuchung der Mäuseseren (siehe 4.2.1) die einheimischen Borreliensämme auf, so daß auf diesen Teilaspekt der serologischen Untersuchung nicht mehr eingegangen werden muß.

Als Schwellenwert für positive Seroreaktionen wurde die Titerstufe 1:64 gewählt. Dieser Titerwert wurde relativ willkürlich festgesetzt, da kein positives Kontrollserum zur Verfügung stand; er entspricht den Erfahrungswerten der Untersucher aus den USA (LISSMAN, 1984; KORNBLATT, 1985 sowie MAGNARELLI, 1985). 44 von 72 Hunden (61%) reagierten dort im IFAT gegen das Borrelien-Antigen in Titerstufen von 1:64 bis 1:16392 (IgG) positiv. Bei 10 Hunden wurden außerdem zusätzlich IgM-Antikörper festgestellt (1:64 bis 1:256).

Von jedem Tier stand jeweils nur eine Serumprobe zur Verfügung. Der Idealfall wäre natürlich, zwei Serumproben die in aufeinanderfolgenden Zeitabständen abgenommen wurden, zu untersuchen. Wenn in einem solchen Fall die zweite Probe einen signifikanten Anstieg des Titers zeigt, so geht eindeutig daraus hervor, daß das Ergebnis gesichert ist.

Wenn man jedoch, wie bei den vorliegenden Untersuchungen, nur über eine Serumprobe verfügt, so muß das positive Ergebnis der Antikörperbestimmung mit Hilfe des IFAT nicht als entscheidender Befund, sondern als ein diagnostischer Beitrag gewertet werden, der zu den anderen Befunden hinzuzählen ist. So kann ein signifikanter Titer in einem Gebiet, das für die Ixodes-Borreliose als endemisch angesehen wird, nur anamnestischen Wert besitzen und eventuell durch eine vorangegangene Infektion bedingt gewesen sein.

Ein anderer entscheidender Faktor ist die Zeit, die vom Beginn der Erkrankung bis zum Datum der Blutentnahme vergeht. Ein geringer Titer bei einem Tier, das vor einigen Wochen an Borreliose erkrankt war, ist von geringer Bedeutung, währenddessen dieser Titer bei einer einwöchigen oder kürzeren Erkrankungszeit mehr Beachtung finden muß.

Auch auf den großen Einfluß einer frühzeitigen Antibiotika-Therapie auf das zeitliche Erscheinen der Antikörper und auf ihren Titer muß hingewiesen werden, Erfahrungswerte in dieser Hinsicht gibt es jedoch für Hunde noch nicht.

10 Hunde hatten gleichzeitig IgG- und IgM-Antikörper gegen Borrelien im Serum. Die Titerhöhen für die IgM-Antikörper waren jedoch relativ niedrig (1:64 bis 1:256). Diese 10 Tiere waren seit kurzem (2 Tage bis 3 Wochen) erkrankt, die klinischen Befunde deuteten auf eine akute Infektionskrankheit hin, wie Fieber und Lymphknotenschwellungen.

Da jedoch noch keine Angaben über den normalen Titerverlauf nach einer Infektion beim Hund existieren, können erhöhte IgM-Titer keinen Beweis für eine vor kurzem eingetretene Borrelieninfektion sein.

Wie klinische und serologische Untersuchungen von Hunden (KORNBLATT 1985) ergaben, kann der Prozentsatz an klinisch inapparenten Infektionen hoch sein. Er wies bei 42% von klinisch unauffälligen Probanden erhöhte Antikörper-Titer gegen Borrelien nach.

Auch BURGESS (1985) stellte fest, daß subklinische Infektionen bei Hunden vorkommen, da die von ihm experimentell mit *B. burgdorferi* infizierten Hunde ohne klinische Symptome blieben.

In der Humanmedizin ist es bis jetzt nur in einigen wenigen Fällen gelungen, Borrelien in Blutkulturen oder aus Organmaterial zu isolieren. Da diese Methode sehr arbeitsaufwendig ist und daher nur wenigen, hochspezialisierten Untersuchungsstellen vorbehalten bleibt, ist die Serologie im Moment die einzige praktikable Untersuchungsmethode, um Hilfeleistung beim Erkennen von Borrelien-Infektionen zu geben.

Der IFAT und auch der ELISA sind relativ einfach durchzuführende sero-diagnostische Verfahren, die auch nicht spezialisierten Laboratorien die Möglichkeit bieten, sich aktiv in die Borrelien-Diagnostik einzuschalten.

Sie haben den Charakter von Such- oder Screeningtests, in dem Sinne, daß evtl. vorhandene spezifische Antikörper durch sie aufgezeigt werden können.

Die Aufgabe des Tierarztes ist es dann, andere Infektionskrankheiten mit Hilfe klinischer Untersuchungen differentialdiagnostisch auszuschließen. So sind zum Beispiel bei wechselseitigen Lahmheiten, die eventuell, wie für die USA (LISSMANN 1984, KORNBLATT 1985) durch die Infektion mit Ixodes-Borrelien hervorgerufen werden können, vorausgegangene Traumata, idiopathische und septische Arthritiden sowie rheumatische Erkrankungen klar abzugrenzen.

Inwieweit chronische Hautveränderungen (bei 25% der seropositiven Tiere) und ekzematische Dermatitiden (bei 9,09% der Hunde) auf eine Infektion zurückzuführen sind, muß ungeklärt bleiben. Eventuell sollte in besonders hartnäckigen Fällen doch versucht werden, Spirochaeten aus den Läsionen zu isolieren.

Erfahrungswerte beim Hund existieren in dieser Hinsicht noch keine.

Abschließend ist zu folgern, daß aufgrund des durchgeführten Serosurveys auch in Europa Infektionen des Haushundes mit Ixodes-Borrelien auftreten. Ob es sich bei den festgestellten klinischen Befunden der zur serologischen Untersuchung vorgestellten Probanden (Arthritis, Fieber mit Lymphknotenschwellungen, Hautveränderungen) um Symptome handelt, die in engem Zusammenhang mit der D. burgdorferi-Infektion stehen, konnte mit dieser Stichprobenuntersuchung nicht geklärt werden.

Es bedarf eingehender, weiterführender Studien, um pathogene Auswirkungen von Ixodes-Borrelien und damit diagnostisch verwertbare klinische Symptome, die speziell auf diese Infektion zurückzuführen sind, auch beim Hund aufzuzeigen. Das eventuelle Auftreten von Kreuzreaktionen zwischen Borrelien und Leptospiren wird bei 4.2.4 erörtert.

4.2.3 Rinderseren

Erfahrungsgemäß sind Weiderinder relativ häufig Zeckenstichen ausgesetzt. Es war interessant, festzustellen, daß auch diese Imaginalwirte, analog zu den untersuchten Hunden, Träger von Borrelien sind und diese somit an die nachfolgende Zeckengeneration weitergeben können.

Es wurden 66 Rinder aus dem süddeutschen Raum auf Antikörper gegen Borrelien untersucht. Der Schwellenwert für positive Reaktionen wurde auf 1:64 festgesetzt. Die Tiere stammten aus dem süddeutschen Raum.

Bei 22 Rindern (33,33%) wurden positive Antikörper gegen Borrelien von 1:64 bis 1:512 erreicht.

Die höchste Antigenität wiesen wieder die drei einheimischen Borrelien-Stämme auf, bei den außereuropäischen wurden deutlich niedrigere Titerwerte erzielt. Auch hier wird deshalb eine antigenetische Identität zwischen den 3 Stämmen einerseits und den Borrelien, die die Antikörperproduktion auslösen, vermutet.

Mit dieser Stichprobenuntersuchung von willkürlich ausgewählten Rindern aus Süddeutschland sollte nur aufgezeigt werden, ob Borrelieninfektionen bei ihnen nachweislich (mit Hilfe des IFAT) auftreten und ob Tiere mit Weidegang stärker betroffen sind als ganzjährig im Stall gehaltene Tiere.

Die Untersuchung ergab, daß ausschließlich Weidetiere Antikörper im Blut aufwiesen.

Diese Aussage kann jedoch nicht verallgemeinert werden, da nur wenige, willkürlich ausgewählte Tiere untersucht wurden. Die Absicht weiterführender Studien sollte sein, eine möglichst flächenabdeckende Untersuchung auf Borreliose bei Rindern für z.B., wie durch diese Stichprobenuntersuchung angeregt werden sollte, den süddeutschen Raum durchzuführen.

Dazu mußten in Vorversuchen jeweils 10% eines Bestandes im IFAT gegen Borrelien getestet werden, bei positiven Reaktionen dann der Gesamtbestand.

Auf diese Weise könnten Borrelieninfektionen gezielt erfaßt werden.

Mit der Untersuchung der 66 Rinder sollte nur der Anfang gemacht werden.

Da es sich bei einem Teil der Probanden um Leptospirose-Patienten handelt (vorausgegangene Untersuchung vom Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim), war es auch bei dieser Tiergruppe sinnvoll, etwaige Kreuzreaktionen zwischen Borrelien und Leptospiren aufzuzeigen.

4.3 Kreuzreaktionen mit Leptospiren

Die Tatsache, daß Haustiere Träger von Leptospiren sein können, die ebenfalls zur Ordnung Spirochaetales gehören, und den Borrelien morphologisch ähnlich sind, ließ die Vermutung aufkommen, daß zwischen den Familien Leptospiraceae und Spirochaetaceae Kreuzreaktionen bei serologischen Tests vorkommen könnten. HYDE und JOHNSON (1984) konnten jedoch keine antigenetische Verwandtschaft zwischen Borrelien und Leptospiren nachweisen.

Auch MAGNARELLI (1985) konnte bei seinen epidemiologischen Studien über die Borrelien-Infektion des Hundes keine direkte Beziehung zwischen der Höhe von Borrelien- und Leptospiren-Titern herstellen. Auffällig war nur, daß Borrelien-positive Hunde höhere durchschnittliche Titer gegen Leptospiren aufwiesen als Borrelien-negative

Dieses Ergebnis konnte nicht bestätigt werden. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich ist, wiesen gerade die Tiere, die im IFAT auf Borrelien negativ reagiert hatten, höhere Leptospiren-Titer auf als diejenigen mit Antikörpern gegen Borrelien.

Außerdem wurden Antikörper gegen die Leptospirenserovare häufiger bei den Borrelien-negativen Hunden festgestellt als bei den seropositiven.

Zusammenfassend ist zu bemerken, daß die Ergebnisse der Untersuchung nicht auf eine Kreuzreaktion mit Leptospiren hindeuten.

Auch bei den Rinderseren konnte keine direkte Beziehung zwischen den Borrelien- und Leptospiren-positiven Probanden hergestellt werden. Auch hier wiesen die Borrelien-negativen Tiere häufiger Antikörpertiter gegen Leptospiren-serovare auf als die Borrelien-positiven.

Allerdings hatten die 22 Probanden, die gleichzeitig antikörper-positiv gegen Borrelien und Leptospiren waren, höhere durchschnittliche Titerwerte gegen die Leptospiren-stämme als die Borrelien-negativen.

Tabelle 14 zeigt jedoch, daß den Leptospirose-Patienten mit hohen Titern (1:1600, 1:3200) niedrige Titerwerte gegen Borrelien-Antikörper entgegenstehen. Es muß also angenommen werden, daß Borrelien- und Leptospiren-Infektionen unabhängig voneinander sind und zur gleichen Zeit im selben Tier vorkommen können und auch diagnostisch auseinander gehalten werden können.

Bei dem positiven und negativen Mausekontrollserum, sowie bei allen untersuchten Mäusen konnten keine Antikörper gegen die Leptospirenservare festgestellt werden. Auch das positive und negative Referenzserum vom Kaninchen, das gegen B. burgdorferi immunisiert worden war, reagierte negativ.

Anzumerken ist, daß es möglich gewesen wäre, auch Leptospirenantigene für den IFAT herzustellen, und analog den Borrelien alle zur Verfügung stehenden Seren mit der indirekten Fluoreszenz auf Leptospiren zu testen.

Da jedoch die vorliegenden Untersuchungen keine Hinweise auf Kreuzreaktionen gaben, wurde darauf verzichtet.

Ebenso wurde es unterlassen, Antiseren gegen alle 22 Leptospirenstämme herzustellen und diese im IFAT gegen Borrelien zu prüfen.

Diese Versuchsreihe hätte jedoch eine große Anzahl an Versuchstieren erfordert. Auch MAGNARELLI (1985), der diese Untersuchungen in den USA durchgeführt hatte, konnte keine Kreuzreaktionen zwischen Borrelien und Leptospiren nachweisen.

Zusammenfassend ist zu bemerken, daß mit den durchgeführten Untersuchungen keine positive Beziehung zwischen Borrelien und Leptospiren im Sinne einer Kreuzreaktion hergestellt werden konnte.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, durch serologische Untersuchungen geeigneter, wenn auch heterogener Stichproben festzustellen, ob einheimische Haus- und Wildtiere als häufige Zeckenwirte in der Epidemiologie der neu entdeckten Schildzecken-Borreliose des Menschen (Erythema-migrans- oder Lyme-Krankheit) auch in Mitteleuropa als Erregerreservoir eine Rolle spielen.

Es sollte ferner ermittelt werden, ob und wo Infektionen von Haustieren mit dem neuen Spirochaeten-Typ in einer Form und Quantität zu erwarten sind, die in Zukunft auch die Aufmerksamkeit und therapeutische Intervention notwendig macht. Es sollten auch verlässliche diagnostische Hinweise erarbeitet werden.

Um die Rolle des einheimischen Rehwildes bei der Übertragung der Ixodes-Borreliose zu überprüfen, wurden Zecken von erlegten Tieren mit Hilfe des direkten Immunfluoreszenztests auf Spirochaeten untersucht. Während des Untersuchungszeitraumes (Mai einschließlich Dezember 1985) wurden 26 Rehe untersucht. 65% waren von Ixodes ricinus befallen. Gefunden wurden Nymphen sowie adulte Stadien.

Von 434 abgelesenen Zecken fanden sich bei 11% Spirochaeten in den angefertigten Darmpräparaten.

Der starke Zeckenbefall und die hohe Durchseuchungsrate von *I. ricinus* mit Borrelien läßt vermuten, daß dieser einheimische Wildwiederkäuer eine Rolle als Reservoir für die Borrelien-Infektion spielt.

Die serologische Untersuchung von 66 Kleinsäugetieren, die mit Lebendfallen im Juni und Juli 1985 aus zwei Gegenden Süddeutschlands (Grafrath bei München, Schwanheim bei Frankfurt am Main) ergab, daß wildlebende Nagetiere bedeutende Naturreservoirs für die Ixodes-Borreliose darstellen, zumal sie häufig von Zecken aufgesucht werden. Die Seren dieser Tiere wurden mit Hilfe des indirekten Fluoreszenz-Antikörpertestes (IFAT) gegen 12 Borrelien-Antigene getestet.

19% der untersuchten Kleinnager reagierten in den Verdünnungsstufen 1:32 bis 1:128 .

Die höchsten Titerwerte wurden gegen die drei einheimischen Stämme gefunden (*Borrelia spec.* Grafrath, *Borrelia spec.* Schwanheim 128, *Borrelia spec.* Österreich 190)

Die seropositiven Tiere gehörten den Arten *Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus* sowie *Clethrionomys glareolus* an.

Zur Untersuchung des Vorkommens von Borrelieninfektionen beim Hund wurden 72 Seren mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztestes (IFAT) auf IgG- und IgM-Antikörper gegen Borreliantigene getestet.

11 Tiere stammten aus Neustadt/Aisch, 61 kamen aus Einsendungen an das Tropeninstitut München.

6 Tiere zeigten Lahmheiten, die anderen 66 Hunde litten an unspezifischen Symptomen wie Lymphadenosis, Fieber und pathologischer Hautaffektionen. Die Krankheitsursache hatte von den behandelnden Tierärzten nicht aufgeklärt werden können.

Von 11 Hunden war bekannt, daß sie im Laufe des Sommers 1985 von Zecken gestochen worden waren. Antikörper gegen Borrelien in Titerstufen von 1:64 bis 1:1632 wurden bei 44 Tieren (61%) gefunden.

Die seropositiv reagierenden Hunde wurden auch auf IgM-Antikörper getestet, 10 davon wiesen gleichzeitig IgM-Titerwerte auf (1:64 bis 1:256).

Die höchsten Werte wurden auch in dieser serologischen Studie gegen die einheimischen Borrelien-Stämme erzielt.

Die dritte serologische Studie wurde vorgenommen, um zu überprüfen, ob landwirtschaftliche Nutztiere ebenfalls Borrelieninfektionen ausgesetzt sind.

66 Seren von Kühen aus dem süddeutschen Raum wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf Antikörper gegen Borrelien getestet.

22 Tiere (33,33%) reagierten seropositiv, in Titerhöhen von 1:64 bis 1:512; diese Tiere hatten alle Weidegang während des Sommers gehabt.

Auch hier wurden die höchsten Titerwerte gegen die einheimischen Antigene erzielt.

Anschließend wurden die Mause-, Hunde- und Rinderseren mit der Mikroagglutinationsreaktion (MAR) auf Antikörper gegen 22 Leptospirenserovare untersucht. Es konnte keine direkte Beziehung zwischen den Titerhöhen gegen Borrelien- und Leptospirenserovare im Sinne einer evtl. auftretenden Kreuzreaktion gefunden werden.

Der indirekte Fluoreszenzantikörpertest hat sich als eine praktikable und sensitive Methode erwiesen, um Antikörper gegen Borrelien in Tierseren nachzuweisen. Er stellt deshalb beim Erkennen der Ixodes-Borreliose eine wichtige labordiagnostische Hilfe dar.

Bark S.: Diagnosis and prevalence of the resident
tick borne borreliosis in mammals

Summary

It was the aim of this study to find out by serological examinations of suitable, though heterogeneous random tests, whether resident domestic and wild animals, which are often attacked by ticks, take part in the epidemiology of the recently discovered Ixodes-borreliosis.

Further it should be investigated if infections of domestic animals with the new Spirochaeta are to be expected in a quantity, which has to attract attention and therapeutic intervention by the veterinary surgeon. Finally reliable diagnostic hints should be developed.

In order to study the role of the European roe-deer (*Capreolus capreolus*) in the transmission of Ixodes-borreliosis, ticks removed from these animals (from May through December 1985), which had been killed by licensed hunters, were searched for antibodies against spirochetes by direct-immunofluorescence microscopy. During the study, 26 deer were examined. 65% were infested with Ixodes ricinus. Of 434 ticks removed and examined, 11% contained spirochetes in their gut preparations.

The high frequency of attachment to deer and the high percentage of infected *Ixodes ricinus* suggests that this resident wild ruminant acts as a reservoir of the tick borne borrelia.

A serologic survey of 66 small mammals, live captured in traps from two areas in the South of West Germany during June and July 1985 resulted, that feral rodents are important natural hosts for the *Ixodes-Spirochete*. Serum samples from these mice were examined by the indirect immunfluorescence antibody test (IFAT) against 12 different *Borrelia* antigens.

19% of the evaluated small animals had antibody titers of 1:32 to 1:128 against the *Borrelia* species.

The highest titer was reached against the three resident *Borrelia* strains (*Borrelia* spec. Grafrath, *Borrelia* spec. Schwanheim, *Borrelia* spec. Österreich 190).

The seropositive rodents belonged to the species *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*.

In order to explore the prevalence of *Borrelia* infections in dog, 72 serum samples were evaluated for IgG and IgM antibodies to *Borrelia* antigens, using the indirect fluorescent antibody technique (IFAT). 11 sera were collected from Neustadt/Aisch, 61 were derived from Tropeninstitut Munich.

6 dogs had lameness, the other 66 dogs suffered from unspecific clinical symptoms, as there are lymphadenosis, fever and pathologic skin affections. The causative agent of illness had not yet been able to be enlightened by the attending veterinary surgeons.

11 dogs were known that they had histories of tick exposure during summer 1985.

IgG-antibodies in titers of 1:64 to 1:1632 were detected in 44 sera. Positive-reacting dogs were retested for Ig'-antibodies. Of these serum samples 10 had Ig'-titers, ranging from 1:64 to 1:256.

In this serologic study highest titers were obtained against the resident *Borrelia*-strains.

The third serologic study was done in order to test whether cattle are also exposed to *Borrelia* infections. 66 sera from cows living in the south of West Germany were evaluated for antibodies to *Borrelia*-antigens using the indirect immunofluorescent antibody technique (IFAT).

22 (33,33%) of the examined animals reacted seropositive with titers from 1:64 to 1:512. All these 22 cows had been put to grass during summer.

In this survey highest antibodies titers were also found against the resident antigens.

Subsequently, all sera from mice, dogs and cows were tested for antibody to 22 *Leptospira* serovars. No direct correlation between antibody titers to the *Leptospira* serovars and to the *Borrelia*-strains in proof of an occurring cross reaction were found.

The indirect fluorescent antibody technique was proved to be a practicable and sensitive test in order to detect antibodies against *Borrelia* spec. in serum samples from animals. It provides an important laboratory help in diagnosis of *Borrelia*-infections.

6. Literaturverzeichnis

- ACKERMANN, R., H.P. BOISTEN, J. KABATZKI, U. RUNNE,
K. KRÜGER, W.P. HERRMANN (1984):
Serumantikörper gegen *Ixodes ricinus*-Spirochäten
bei Acrodermatitis chronica atrophicans (Herxheimer)
Dtsch. Med. Wochenschr. 109, 6-10
- ACKERMANN, R., J. KABATZKI, H.P. BOISTEN, A.C. STEERE,
R.C. GRODZICKI, S. HARTUNG, U. RUNNE (1984):
Spirochäten-Etiologie der Erythema-chronicum-migrans-
Krankheit
Dtsch. Med. Wochenschr. 109, 92-97
- ASBRINK, E., J. OLSEN (1985):
Clinical manifestations of Erythema chronicum migrans
Afzelius in 161 patients
Acta Derm. Venereol. 65, 506-512
- AFZELIUS, A. (1921):
Erythema chronicum migrans
Acta Derm. Venereol. 2, 120-125
- ANDERSON, J.F., L.A. MAGNARELLI, W. BURGDORFER, A.G. BARBOUR;
(1983):
Spirochetes in *Ixodes dammini* and mammals from
Connecticut
Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 818-824
- ANDERSON, J.F., L.A. MAGNARELLI (1984):
Avian and mammalian hosts for spirochete-infected
ticks and insects in a Lyme disease focus in
Connecticut
Yale J. Biol. Med. 57, 627-641
- ANDERSON, J.F., R.C. JOHNSON, L.A. MAGNARELLI, F.W. HYDE
(1985):
Identification of endemic foci of Lyme disease:
Isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral
rodents and ticks (*Dermacentor variabilis*)
J. Clin. Microbiol. 22, 36-38
- ANDERSON, J.F., R.C. JOHNSON, L.A. MAGNARELLI, F.W. HYDE,
J. E. MYERS (1986):
Peromyscus leucopus and *Microtus pennsylvanicus*
simultaneously infected with *Borrelia burgdorferi*
and *Babesia microti*
J. Clin. Microbiol. 23, 135-137

- BARBOUR, A.G., W. BURGDORFER, S.F. HAYES, O. PETER,
A. AESCHLI-MANN (1983):
Isolation of a cultivable spirochete from *I. ricinus*
ticks in Switzerland
Curr. Microbiol. 8, 123-126
- BARBOUR, A.G., S.L. TESSIER, W.J. TODD (1983):
Lyme disease spirochetes and Ixodid tick spirochetes
share a common surface antigenetic determinant
defined by a monoclonal antibody
Infect. Immun. 41, 795-804
- BARBOUR, A.G. (1984):
Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes
Yale J. Biol. Med. 57, 521-528
- BARBOUR, A.G. (1984):
Immunochemical analysis of Lyme disease spirochetes
Yale J. Biol. Med. 57, 581-586
- BECK, G., G.S. HABICHT, J.L. BENACH, J.L. COLEMAN (1985):
Chemical and biologic characterization of a
lipopolysaccharide extracted from the Lyme disease
spirochete (*Borrelia burgdorferi*)
J. Infect. Dis. 152, 108-117
- BENACH, J.L., E.H. BOSLER, J.P. HANRAHAN, J.L. COLEMAN,
G.S. HABICHT, T.F. BAST, D.J. CAMERON, J.L. ZIEGLER,
A.G. BARBOUR, W. BURGDORFER, R. EDELMAN, R.A. KASLOW
(1983):
Spirochetes isolated from the blood of two patients
with Lyme disease
New Eng. J. Med. 308, 740-742
- BENACH, J.L., G.S. HABICHT, B.L. GOCINSKI, J.L. COLEMAN
(1984):
Phagocytic cell responses to in vivo and in vitro
exposure to the Lyme spirochete
Yale J. Biol. Med. 57, 599-605
- BERGEY, D.H. (1984):
Bergey's manual of systematic bacteriology,
9th edition, volume 1
Williams and Williams Company Baltimore, S. 38-62
- BINDER, E., R. DÖPFNER, O. HORNSTEIN (1955):
Experimentelle Übertragung des Erythema chronicum migrans
von Mensch zu Mensch
Hautarzt 6, 494-496

- BOSLER, E.M., J.L. COLEMAN, J.L. BENACH, A.D. MASSEY,
J.P. HANRAHAN, W. BURGDORFER, A.G. BARBOUR (1983):
Natural distribution of the *Ixodes dammini* spirochete
Science 220, 321-322
- BOSLER, E.M., B.G. ORMISTON, J.L. COLEMAN, J.P. HANRAHAN,
J.L. BENACH (1984):
Prevalence of the Lyme disease spirochete in populations
of white-tailed deer and white-footed mice
Yale J. Biol. Med. 57, 651-659
- BRINK, VAN DEN, F.H. (1957):
Die Säugetiere Europas
Verlag Paul Parey, S. 81-105, 140-146
- BURGDORFER, W., A.G. BARBOUR, S.F. HAYES, J.L. BENACH,
E. GRUNWALDT, J.P. DAVIS (1982):
Lyme disease - a tick-borne spirochetosis?
Science 216, 1317-1319
- BURGDORFER, W., A.G. BARBOUR, S.F. HAYES, O. PETER,
A. AESCHLI-MANN (1983):
Erythema chronicum migrans : a tick-borne spirochetosis
Acta Trop. 40, 79-83
- BURGDORFER, W. (1984):
The New Zealand white rabbit: An experimental host
for infecting ticks with Lyme disease spirochete
Yale J. Biol. Med. 57, 609-612
- BURGDORFER, W. (1984):
Discovery of the Lyme disease spirochete and its
relation to tick vectors
Yale J. Biol. Med. 57, 515-520
- BURGDORFER, W., R.S. LANE, A.G. BARBOUR, R.A. GRESBRINK,
J.R. ANDERSON (1985):
The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*:
A vector of *Borrelia burgdorferi*
Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 925-930
- BURGER, J., A. RADDA, G. HEWALKA, G. STANEK (1985):
Untersuchungen zur Ökologie von *Borrelia burgdorferi*
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitolog. 7, 51-54

- BURGESS, E.C. (1985):
Experimental infection in dogs with *Borrelia burgdorferi*
Second international symposium on Lyme disease and
related disorders, Vienna, Austria, September 17-19th, 1985
Compendium of abstracts. Hygiene Institute of the
University of Vienna, S. 13
- BURT, H.W., R.P. GRASSENHEIDER (1976)B
A field guide to the mammals, 3rd edition
Houghton Mifflin Company Boston, S. 91-124
156-165
215-218
- CRAFT, J.E., R.L. GRODZICKI, A.C. STEERE (1984):
Antibody responses in Lyme disease. Evaluation of
diagnostic tests
J. Infect. Dis. 149, 789-795
- DEGOS, R., R. TOURAINE, J. AROUETE (1962):
L'erythema chronicum migrans (discussion d'une origine
rickettsienne)
Ann. Dermatol. Venereol. 89, 247-260
- GARIN, C., BUJADOUX (1922):
Paralysis par les tiques
J. Med. Lyon 71, 765
- GELBJERG-HANSEN, G. (1945):
Erythema chronicum migrans Afzelius and meningitis
after tick bite
Acta Derm. Venereol. 89, 247-260
- GOLDIN, D., R.H. CHAMPION, A. ROCK, S.O.B. ROBERTS (1978):
Erythema chronicum migrans in Britain
Br. Med. J. 2, 1087
- GOMEZ, E.P. (1983):
La enfermedad del Lyme: nueva enfermedad infecciosa
Med. Clin. 81, 856-858
- HARD, S. (1966):
Erythema chronicum migrans (Afzelii) associated
with mosquito bite
Acta Derm. Venereol. 46, 473-476

- HERZER, P. (1983):
Lyme-Krankheit: Eine neue oder neu erkannte klinische
Entität
Munch. Med. Wochenschr. 125, 737-738
- HOLLSTRÖM, E. (1978):
Penicillin treatment of erythema chronicum migrans
Afzelius
Acta Derm. Venereol. 38, 285-289
- HOOGSTRAAL, H. (1979):
Ticks and spirochetes
Acta Trop. 36, 133-136
- HOVIND-HOUGEN, K. (1984):
Ultrastructure of spirochetes isolated from Ixodes
ricinus and Ixodes dammini
Yale J. Biol. Med. 57, 543-548
- HYDE, F.W., R.C. JOHNSON (1984):
Genetic relationship of Lyme disease spirochetes
to Borrelia, Treponema and Leptospira spp.
J. Clin. Microbiol. 20, 151-154
- JOHNSON, R.C., G.F. SCHMID, F.W. HYDE, A.G. STEIGERWALT,
D.J. BRENNER (1984):
Borrelia burgdorferi sp. nov.: Etiologic agent of
Lyme disease
Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 496-497
- KELLY, R. (1971):
Cultivation of Borrelia hermsi
Science 173, 443
- KORNBLATT, A.N., A.C. STEERE, D.G. BROWNSTEIN (1984):
Infections of rabbits with the Lyme spirochete
Yale J. Biol. Med. 57, 613-614
- KORNBLATT, A.N., P.H. URBAND, A.C. STEERE (1985):
Arthritis caused by Borrelia burgdorferi in dogs
J. Am. Vet. Med. Assoc. 186, 960-964

KRAMPITZ, H.E., (1983):

Ober einige potentiell pathogene Mikroorganismen aus
einheimischen Schildzecken (*Babesia microti*,
Haemobartonellen, *Spirochäten*)
in J. BOCH (Hrsg): Tropenmed. Parasitol. Gemeins. Tg.
Tropenmed. Ges. Garmisch-Partenkirchen 1983
P. Lang Verl. Ffm. ect. 1984, S. 347-351

KRAMPITZ, H.E. (1985):

In vivo isolation and maintenance of European hard tick
spirochetes in mammalian and arthropod hosts
Second international symposium on Lyme disease
and related disorders
Vienna, Austria, September 17-19, 1985
Compendium of abstracts. Hygiene Institute of the
University of Vienna, S.2

KRISTOFERITSCH, W., K. SPIEL, P. WESSELY (1983):

Meningopolyneuritis (GARIN-BUJADOUX-BANNWARTH)
Klinik und Laborbefunde
Nervenarzt 54, 640-646

LENHOFF, C. (1984):

Spirochetes in aetiologically obscure diseases
Acta Derm. Venereol. 28, 295-324

LEVINE, J.F., M.L. WILSON, A. SPIELMAN (1985):

Mice as reservoirs of the Lyme disease spirochete
Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 355-360

LIPSCHOTZ, B. (1913):

Ober eine seltene Erythemform (*Erythema chronicum migrans*)
Arch. Derm. Res. 118, 349-356

LISSMANN, E.A., E.M. BOSLER, H. CAMAY, B.C. ORMISTON,
J.L. BENACH (1984):

Spirochete associated arthritis (Lyme disease) in a dog
J. Am. Vet. Med. Assoc. 185, 219-220

MAGNARELLI, L.A., J.F. ANDERSON, W. BURGDOFFER, W.A. CHAPEL
(1984):

Parasitism by *Ixodes dammini* (Acari. Ixodidae) and anti-
bodies to spirochetes in mammals at Lyme disease foci in
Connecticut, USA
J. Med. Entomol. 21, 52-57

- MAGNARELLI, L.A., J.F. ANDERSON, W.A. CHAPPELL (1984):
Antibodies to spirochetes in white tailed deer and
prevalence of infected ticks from foci of Lyme disease
in Connecticut
J. Wildl. Dis. 20, 21-26
- MAGNARELLI, L.A., J.M. WEEGAN, J.F. ANDERSON, W.A. CHAPPELL
(1984):
Comparison of an indirect fluorescent antibody test with
an enzyme-linked immunosorbent assay for serological
studies of Lyme disease
J. Clin. Microbiol. 20, 181-184
- MAGNARELLI, L.A., J.F. ANDERSON, A.F. KAUFMANN, L.L. LIEBERMANN
(1985):
Borreliosis in dogs from southern Connecticut
J. Am. Vet. Med. Assoc. 186, 955-959
- MAIN, A.G., H.E. SPRANCE, K.O. KLOTZ, S.E. BROWN (1981):
Ixodes dammini (Acari: Ixodidae) on white-tailed deer
(Odocoileus virginianus) in Connecticut
J. Med. Entomol. 18, 487-492
- MARCUS, J.C., M. PATTERSON, R.E. GILFILAN, P.H. URBAND (1985):
Antibodies to Borrelia burgdorferi in New England
horses: Serologic survey
Am. J. Vet. Res. 46, 2570-2571
- MELSON, R.S. (1951):
Erythema chronicum Afzelius
Nord. Med. 62, 770-771
- MOFFAT, C.M., L.H. SIGAL, A.C. STEERE, D.H. FREEMAN,
J.M. DWYER (1984):
Cellular immune findings in Lyme disease
Am. J. Med. 77, 625-632
- MOLLER, W. (1984):
Die Lyme-Arthritis (Erythema-migrans-Arthritis)
Schweiz. Med. Wochenschr. 114, 265-269
- NEUBERT, U. (1984):
Zur Ätiologie von Erythema-migrans-Krankheit und Lyme-
Erkrankung
Hautarzt 35, 563-578

- NEUBERT, U., H.E. KRAMPITZ (1985):
Microbiological findings in erythema chronicum migrans,
Acrodermatitis chronica atrophicans and lymph-
adenosis benigna
Second international symposium on Lyme disease and
related disorders, Vienna, Austria, September 17-19, 1985
Compendium of abstracts, Hygiene Institute of the
University of Vienna, S. 35
- PIESMAN, J., A. SPIELMANN (1979):
Host associations and seasonal abundance of immature
Ixodes dammini in Southeastern Massachusetts
Ann. Entomol. Soc. Am. 72, 275-276
- PREAC-MURSIC, V., G. SCHIERZ, H.-W. PFISTER (1984):
Isolierung einer Spirochäte aus Liquor cerebrospinalis
bei Meningoradiculitis - BANNWARTH
Münch. Med. Wochenschr. 126, 275-276
- PREAC-MURSIC, V. (1984):
Zeckenspirochätosen
Münch. Med. Wochenschr. 126, 1415-1416
- ROLLE, U., A. MAYR (1984):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Verlag Enke, S. 169-182
- RUSSELL, H., J.S. SAMPSON, C.P. SCIPID, H.W. WILKINSON,
B. PLIKAYTIS (1984):
Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect
Immunofluorescence assay for Lyme disease
J. Infect. Dis. 149, 465-470
- SCIPIDT, R., J. KABATZKI, S. HARTUNG, R. ACKERMANN (1985):
Erythema-migrans-Borreliose in der Bundesrepublik
Deutschland
Dtsch. Med. Wochenschr. 110, 1803-1807
- SCHULZE, T.L., T.S. BOUEN, E.M. BOSLER, M.F. LAKAT,
W.E. PARKIN, R. ALTMAN, B.G. ORMISTON, J.K. SHISLER (1984):
Amblyomma americanum. A potential vector of Lyme disease
in New Jersey
Science 224, 601-603

- SCHULZE, T.L., W.F. LAKAT, G.S. BOWEN, W.E. PARKIN,
J.K. SHISLER (1984):
Ixodes dammini (Acari: Ixodidae) and other Ixodid ticks
collected from white-tailed deer in New Jersey, USA
I. Geographical distribution and physical factors
J. Med. Entomol. 21, 741-749
- SCRIMENTI, R.J. (1970):
Erythema chronicum migrans
Arch. Dermatol. 102, 104-105
- STANEK, G., G. WEWALKA, V. GROH, R. NEUMANN (1985):
Isolation of spirochetes from the skin of patients
with erythema chronicum migrans in Austria
Zentralbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. Abt. 1, Orig. A,
260, 88-90
- STEERE, A.C., S.E. MALAWISTA, J.A. HARDIN, S. RUDDY,
P.W. ASKENASE, W.A. ANDAMAN (1977):
Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis
in children and adults in three Connecticut communities
Arthritis Rheum. 20, 7
- STEERE, A.C., T.E. BRODERICH, S.E. MALAWISTA (1978):
Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis:
Epidemiologic evidence for a tick vector
Am. J. Epidemiol. 108, 312-321
- STEERE, A.C., S.E. MALAWISTA, J.H. NEUMANN, P.N. SPIELER,
N.H. BARTENHAGEN (1980):
Antibiotic therapy in Lyme disease
Ann. Intern. Med. 93, 1-8
- STEERE, A.C., R.L. GRODZICKI, A.N. KORNBLATT (1983):
The spirochetal etiology of Lyme disease
N. Engl. J. Med. 308, 733-740
- STEWART, A., J. CLASS, A. PATEL, G. WATT, A. CRIPPS,
R. CLANCY (1982):
Lyme arthritis in the Hunter Valley
Med. J. Aust. 1, 139
- STIERNSTEDT, G., B. SKÜLDENBERG, B. VANDVIK, B. HELDENSTEDT,
A. GARDE, G. KOLMODIN, H. JÜRBECK, B. SVENUNGSSON (1984):
Chronic meningitis and Lyme disease in Sweden
Yale J. Biol. Med. 57, 491-497

- STOENNER, H.G., T. DODOL, C. LARSON (1982):
Antigenetic variations of *Borrelia hermsii*
J. Exp. Med. 156, 1297-1311
- URUNEULA, S., D. DIAZ (1977):
Eritema crónica migrans
Actas Dermo.-Sifiliogr. 68, 109-110
- WEBER, K. (1974):
Erythema-chronicum-migrans-Meningitis - Eine bakterielle
Infektionskrankheit?
Münch. Med. Wochenschr. 85, 1993-1998
- WEBER, K., (1983):
Erythema-migrans-Krankheit
Dtsch. Med. Wochenschr. 108, 1182-1190
- WEBER, K., G. SCHIERZ, B. WILSKE, V. PREAC-MURSIC (1984):
Das Lymphozytom - Eine Borreliose?
Z. Hautkr. 60, 1585-1598
- WILSKE, B., G. SCHIERZ, V. PREAC-MURSIC, K. WEBER,
H.-W. PFISTER, K. EINHÄUPL (1984):
Serological diagnosis of erythema migrans disease
and related disorders
Infection 12, 331-337
- WILSKE, B., P. MÜNCHEHOFF, G. SCHIERZ, V. PREAC-MURSIC,
M. ROGENDORF, G. ZOULEK (1985):
Zur Epidemiologie der Borrelia-burgdorferi-Infektion
Münch. Med. Wochenschr. 127, 171-172
- WILSON, M.J., J.F. LEVINE, A. SPIELMAN (1984):
Effect of deer reduction on abundance of the deer tick
(*Ixodes dammini*)
Yale J. Biol. Med. 57, 697-705
- WÜRTH, W.D. (1985):
Therapie der Erythema-migrans-Krankheit (Lyme-Krankheit)
Dtsch. Med. Wochenschr. 110, 1379-1380

Herrn Prof. Dr. H.E. Krampitz danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit unter idealen Bedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau W. Krampitz für ihr stets gezeigtes Entgegenkommen und liebenswürdige Hilfe in den technischen Fragen.

Herrn Dr. S. Brehm, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim, möchte ich herzlich für die Bereitstellung von 66 Rinderseren und 22 Leptospirenserovaren sowie für die freundliche und stets bereitwillige Hilfe bei der Durchführung der Mikroagglutinationsreaktion bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. B. Wilske und Frau K. von Busch, Max-von-Pettenkofer-Institut, München, für die freundliche Einführung in den direkten Immunfluoreszenztest sowie für die Zurverfügungstellung des positiven und negativen Kaninchen-Kontrollserums.

Frau Dr. E. Pflugrath, Neustadt/Aisch danke ich herzlich für die Überlassung der Hundeseren.

Schließlich bedanke ich mich bei Frau S. Wegerdt für die technische Anleitung in der Serologie.

Lebenslauf

Am 28. Januar 1959 wurde ich in Windsheim, jetzt Bad Windsheim, als Tochter von Heinz Bark und seiner Ehefrau Gerlinde Bark geb. Fluhrer geboren.

Von 1965 bis 1969 besuchte ich die Grundschule und in den Jahren 1969 bis 1978 das Georg-Wilhelm-Steller-Gymnasium in Bad Windsheim. Im Juli 1978 beendete ich meine schulische Ausbildung mit dem Abitur.

Im Februar 1979 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München und schloß es im Mai 1985 mit dem Staatsexamen ab. Seit dieser Zeit war ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertationsarbeit am Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München beschäftigt.

